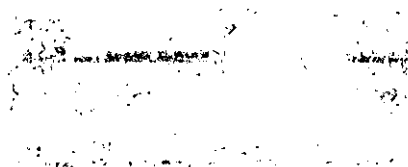


UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



DESARROLLO Y ESTANDARIZACIÓN
DE UN BANCO DE SANGRE DE
CORDÓN UMBILICAL

TESIS DOCTORAL

Rafael Bornstein Sánchez
Madrid, 1999

T 23952

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



* 5 3 0 9 8 8 6 9 0 X *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

618129742

i24780157

DESARROLLO Y ESTANDARIZACIÓN DE UN BANCO
DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL

Memoria que para optar al Grado de Doctor en
Medicina presenta el
Lcdo.: **Rafael Bornstein Sánchez.**

Directora: **Dra. Florinda Gilsanz Rodríguez**
Profesora Titular de la U.C.M.
Facultad de Medicina.

Madrid, Diciembre de 1999



BIBLIOTECA

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado gracias a la colaboración de los Servicios de Hematología y Hemoterapia, Obstetricia y Ginecología, Inmunología y Microbiología del Hospital 12 de Octubre de Madrid, así como del Laboratorio de Citometría de Flujo del Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital de Getafe. Además, el respaldo institucional y la confianza depositada en nuestro centro han permitido generar las infraestructuras necesarias para la creación del Banco de Sangre de Cordón Umbilical del INSALUD, con sede en el Hospital 12 de Octubre, cuyo desarrollo ha dado lugar a esta tesis doctoral.

Agradezco a la Prof. Florinda Gilsanz haber aceptado dirigir esta tesis, los estímulos para iniciar el trabajo y desarrollar las diferentes etapas del mismo, así como todo el apoyo prestado.

A la Dra. Claude Auray agradezco su contribución en muchos de los análisis realizados y la dedicación constante en la recogida y procesamiento de la numerosa información manejada. Asimismo, debo agradecer el apoyo de todos los miembros del Servicio de Hematología, siendo destacable el esfuerzo de las enfermeras y técnicos de laboratorio que han posibilitado la ejecución de este estudio. Quiero mencionar entre ellos a Paloma García por su vinculación más directa al mismo.

Agradezco al Prof. Pedro de la Fuente, al Dr. Jesús Grande, al Dr. Alberto Galindo, y a todas las enfermeras del Departamento de Obstetricia y Ginecología que han participado en la obtención de las unidades de sangre de cordón umbilical, en especial a Teresa Cabrera y Eloísa Muñoz, la ilusión que han demostrado tener en este proyecto desde su inicio y la constante dedicación al mismo.

Al Prof. Antonio Arnaiz y al Dr. Jorge Martínez-Laso agradezco la valiosa contribución de los estudios de tipaje HLA y las sugerencias aportadas por ambos en este campo.

Al Prof. Antonio Noriega y al Dr. Antonio Fuertes tengo que agradecer los estudios microbiológicos que han tenido que llevarse a cabo para la validación final de las unidades de sangre de cordón umbilical.

Mi agradecimiento al Dr. José García Vela por su inestimable colaboración en los estudios con citometría de flujo que han resultado en la caracterización fenotípica del sistema linfohematopoyético de sangre de cordón umbilical. Deseo dejar aquí constancia de su disposición permanente a prestar la ayuda necesaria y de su gran profesionalidad.

Agradezco la generosidad de los padres que han aceptado donar de manera altruista la sangre de cordón durante el nacimiento de sus hijos. Sin su especial e imprescindible contribución, esta tesis y el Banco de Sangre de Cordón Umbilical establecido hubieran sido imposibles.

En último lugar, al tratarse de las personas de mayor importancia para mí, quiero señalar con especial cariño y el reconocimiento más profundo la ayuda que mi familia y amigos no han dudado en proporcionarme a lo largo de todo el tiempo que he necesitado para escribir esta tesis. Al haber contado siempre con su comprensión y ánimo, haber podido afrontar un reto como es éste gracias a su apoyo incondicional y aprendido de ellos tantas cosas que van más allá de la propia técnica y, en definitiva, haber trabajado en cercanía de quienes me son tan queridos, creo que no exagero al afirmar que esta tesis es igualmente tan suya como mía.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	3
1.- LA SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL COMO FUENTE DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS	4
1.1.- Antecedentes históricos	6
1.2.- Resultados clínicos del trasplante no relacionado de SCU	7
1.3.- Características biológicas de la SCU	10
1.3.1.- Propiedades inmunológicas de las células de SCU	11
1.3.2.- Frecuencia de células progenitoras hematopoyéticas en SCU	12
1.3.3.- Fenotipo de las células progenitoras hematopoyéticas en SCU	13
1.3.4.- Diferencias funcionales <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> entre células progenitoras hematopoyéticas de SCU y MO adulta	14
1.3.5.- Expansión <i>ex vivo</i> de SCU	16
2.- PROGRAMAS DE BANCOS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL	19
2.1.- Procesamiento de SCU y su influencia en los resultados clínicos de trasplante de SCU	20
2.2.- Implicaciones sobre la actividad de los Bancos de SCU derivadas de la experiencia en trasplante de SCU	21
2.2.1.- Contenido celular de las unidades de SCU	23
2.2.2.- Tipaje HLA de clase I y clase II de alta resolución	24
2.2.3.- Actividad injerto contra leucemia (ICL) de la SCU	25
OBJETIVOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	29
1.- MATERIALES	30
1.1.- Impresos para la donación de SCU	30
1.2.- Material para la obtención de SCU	30
1.3.- Material para el procesamiento y caracterización de SCU	30

1.4.- Reactivos para el procesamiento y caracterización de SCU	30
1.5.- Muestras	32
2.- MÉTODOS	33
2.1.- Selección de donantes de SCU	33
2.2.- Obtención de SCU	33
2.2.1.- Placenta <i>intra utero</i> (Fracción 1ª)	34
2.2.2.- Placenta <i>ex utero</i> (Fracción 2ª)	34
2.2.3.- Conservación de las unidades de SCU hasta el procesamiento	34
2.3.- Procesamiento de las unidades de SCU	35
2.3.1.- Identificación	35
2.3.2.- Muestra de suero materno	35
2.3.3.- Sangre de cordón umbilical	35
2.3.3.1.- Separación celular con gradientes de densidad	36
2.3.3.2.- Sedimentación de hematíes con metilcelulosa 1%	36
2.3.3.3.- Sedimentación de hematíes con gelatina 3.5%	37
2.3.3.4.- Sedimentación de hematíes con hidroxietil almidón 6%	37
2.3.3.5.- Criopreservación	37
2.3.3.6.- Descongelación	39
2.4.- Recuento y viabilidad celular	39
2.5.- Análisis por citometría de flujo	39
2.5.1.- Análisis de antígenos de superficie	39
2.5.2.- Análisis de citocinas intracelulares	40
2.6.- Cultivos de progenitores hematopoyéticos	41
2.7.- Determinación de antígenos HLA	41
2.7.1.- Antígenos HLA de clase I	42
2.7.2.- Antígenos HLA de clase II	43
2.8.- Análisis estadístico	43
2.8.1.- Comparación de muestras independientes (prueba U de Mann-Whitney)	43
2.8.2.- Comparación de variables categóricas (prueba de Chi-cuadrado)	44
2.8.3.- Comparación de medias (prueba <i>t</i>)	44
2.8.4.- Análisis de correlación bivalente	44
2.8.5.- Regresión lineal	44

RESULTADOS	46
1.- CARACTERÍSTICAS HEMATOPOYÉTICAS E INMUNOLÓGICAS DE LA SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL. ANÁLISIS DE LA MUESTRA DE ESTUDIO	47
1.1.- Células nucleadas totales en SCU	48
1.2.- Células primitivas y progenitoras hematopoyéticas de SCU. Comparación con médula ósea y sangre periférica movilizada del adulto	50
1.2.1.- Análisis fenotípico de células CD34 ⁺	51
1.2.1.1.- Células primitivas	52
1.2.1.2.- Células progenitoras granulocito-macrofágicas	53
1.2.1.3.- Células progenitoras megacariocíticas	54
1.2.1.4.- Células progenitoras linfoides B	55
1.2.2.- Células formadoras de colonias	56
1.2.2.1.- CFU-GEMM, CFU-GM y BFU-E	56
1.2.2.2.- CFU-Mk	58
1.3.- Células linfocitarias de SCU. Comparación con sangre periférica de adulto	59
1.3.1.- Análisis fenotípico de poblaciones linfocitarias	59
1.3.1.1.- Linfocitos T	60
1.3.1.2.- Linfocitos B	64
1.3.1.3.- Células NK	65
1.3.2.- Producción de citocinas por linfocitos T	66
2.- CRITERIOS DE SELECCIÓN DE DONANTES DE SCU	70
2.1.- Exclusiones predonación	71
2.2.- Exclusiones en el periodo inmediato postparto	73
2.2.1.- Infecciones bacterianas	73
2.2.2.- Infecciones víricas y parasitarias	74
2.2.3.- Enfermedades hereditarias	76
2.3.- Control a los 90 días del parto	76
2.3.1.- Tasa de cumplimentación	76
2.3.2.- Infecciones víricas y parasitarias	76
2.3.3.- Enfermedades hereditarias	77
2.3.4.- Confirmación del tipaje HLA mediante el haplotipo materno	78
3.- ESTANDARIZACIÓN DE LOS MÉTODOS DE OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LA SCU	79
3.1.- Optimización del procedimiento de obtención de SCU	79
3.1.1.- Volumen y celularidad total de las unidades de SCU	80

3.1.2.- Recogida de SCU mediante punción de la vena umbilical	82
3.1.3.- Obtención complementaria de SCU mediante perfusión de la placenta	82
3.2.- Efecto de distintas medidas de asepsia preventivas de contaminación bacteriana durante la recogida de SCU	85
3.3.- Repercusión del intervalo entre la obtención y el procesamiento de la SCU sobre la viabilidad celular	86
3.3.1.- Células nucleadas	88
3.3.2.- Células progenitoras hematopoyéticas	90
3.4.- Factores predictivos de volumen y celularidad de las unidades de SCU	94
3.4.1.- Variables dependientes	95
3.4.2.- Variables predictoras	96
3.4.3.- Modelos de regresión múltiple	97
3.5.- Separación celular y reducción de volumen. Recuperación obtenida con los diferentes métodos de fraccionamiento	100
3.5.1.- Gradientes de densidad	102
3.5.2.- Agentes de sedimentación	104
3.6.- Criopreservación	106
3.6.1.- Optimización de los programas de congelación según formato y volumen	108
3.6.2.- Viabilidad de SCU criopreservada en diferente formato y volumen	108
3.6.3.- Efecto del almacenamiento transitorio a - 80°C previo al definitivo en nitrógeno líquido a - 196°C	111
3.7.- Descongelación	113
4.- VALIDACIÓN DE LAS UNIDADES PROCESADAS DE SCU	115
4.1.- Tipaje HLA. Frecuencias alélicas y de haplotipos en las unidades de SCU procesadas	116
4.2.- Criterios finales de elegibilidad	119
4.2.1.- Consentimiento informado	119
4.2.2.- Obtención/Procesamiento/Congelación	120
4.2.3.- Historia materna y familiar	121
4.2.4.- Revisión de los resultados analíticos	122
4.3.- Envío de unidades de SCU validadas al Registro Español de Donantes de Médula Ósea (REDMO)	122

DISCUSIÓN		124
CONCLUSIONES		153
BIBLIOGRAFÍA		155
ANEXOS		180
Anexo I	Hoja de información sobre la donación de sangre de cordón umbilical.	181
Anexo II	Consentimiento informado para la donación voluntaria de sangre de cordón umbilical.	184
Anexo III	Protocolo de obtención de sangre de cordón umbilical Recogida de datos de la madre Recogida de datos de paritorio Recogida de datos del recién nacido Recogida de datos de serología y lactante	187
Anexo IV	Recogida de datos del fraccionamiento y criopreservación	192
Anexo V	Solicitud de búsqueda de unidades de SCU compatibles	195
Anexo VI	Informe preliminar de compatibilidad	197
Anexo VII	Informe definitivo de unidades compatibles	199

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

BFU-E	Célula formadora de <i>bursts</i> eritroides
CFU-GEMM	Célula formadora de colonias mixtas (granulocito-eritroblasto-macrófago-megacariocito)
CFU-GM	Célula formadora de colonias granulocito-macrofágicas
CFU-Mk	Célula formadora de colonias megacariocíticas
CMV	Citomegalovirus
DMSO	Dimetilsulfóxido
EICH	Enfermedad injerto contra huésped
HBsAg	Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B
HES	Hidroxietil almidón
HLA	Sistema mayor de histocompatibilidad (<i>human-leucocyte-antigens</i>)
ICL	Actividad injerto contra leucemia
IFN- γ	Interferón- γ
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
MO	Médula ósea
PMA	forbol-12-miristato-13-acetato
REDMO	Registro Español de Donantes de Médula Ósea
SCID/NOD	Cepa murina con inmunodeficiencia severa combinada / diabetes sin obesidad
SCU	Sangre de cordón umbilical
SPA	Sangre periférica de adulto
SPM	Sangre periférica movilizada
TPH	Trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas
VHC	Virus de la hepatitis C
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

INTRODUCCIÓN

1.- LA SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL COMO FUENTE DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS.

El trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas (TPH) de médula ósea (MO) y sangre periférica movilizada (SPM) constituye un tratamiento estándar en determinadas enfermedades malignas, anemia aplásica severa adquirida, anemia aplásica constitucional, inmunodeficiencias congénitas y enfermedades metabólicas hereditarias (Gratwohl y cols., 1996). Sin embargo, y a pesar del progreso mantenido en este campo desde los años 70, cuando se consiguieron llevar a cabo con éxito los primeros trasplantes de MO, no se han podido solventar las importantes limitaciones de las que todavía adolece esta terapia. Entre ellas, caben citarse la carencia de donantes compatibles en los antígenos del sistema HLA en cerca del 50% de los pacientes, aún cuando los registros internacionales cuentan en la actualidad con más de 1.5 millones de donantes de médula ósea HLA-A, -B y -DR tipados (Confer, 1997), y la elevada toxicidad inherente al procedimiento. Esta última se relaciona con: i) complicaciones precoces producidas principalmente por daño endotelial, representado en su más dramática expresión por la enfermedad hepática veno-oclusiva (Bearman, 1995; Carreras y cols., 1998), neumonitis intersticial idiopática (Kantrow y cols., 1997) y microangiopatía trombótica/síndrome urémico hemolítico (Schriber y Herzig, 1997); ii) la alta incidencia y severidad de enfermedad injerto contra huésped (EICH) aguda y crónica, aunque, por otro lado, puede ofrecer como contrapartida protección inmune frente a la recidiva tumoral (Weisdorf y cols., 1990; Kernan y cols., 1993; Ochs, 1994); iii) el riesgo de infecciones en el periodo de aplasia, durante la fase de EICH aguda y en periodos más tardíos (Wingard, 1990; Zaia, 1990); y iv) complicaciones diferidas que afectan a diferentes órganos y sistemas (Borgstrom y Bolme, 1994; Cohen y cols., 1995; Apperley y Reddy, 1995; Deeg y Socié, 1998)

El descubrimiento en la sangre de cordón umbilical (SCU) de un número elevado de células progenitoras hematopoyéticas (Nakahata y Ogawa, 1982; Broxmeyer y cols., 1989) y el éxito del primer trasplante realizado en 1988 en un paciente con Anemia de Fanconi (Gluckman y cols., 1989), impulsaron el desarrollo de programas de bancos de SCU en New York, Düsseldorf y Milán en 1993, y posteriormente en otras ciudades de Norteamérica, Europa, Japón

y Australia durante 1993-1998. Con el establecimiento de estos bancos se pretendió, por una parte, aliviar la falta de donantes de MO, por otra, acortar el proceso de búsqueda de los mismos. En el momento presente, diferentes bancos de SCU tienen disponibles, para su utilización clínica por cualquier centro de trasplante en todo el mundo, cerca de 20.000 unidades HLA tipadas y almacenadas en nitrógeno líquido, evaluadas en cuanto al riesgo de enfermedades infecciosas y hereditarias potencialmente transmisibles, y caracterizadas en su capacidad hematopoyética. La experiencia recogida en aproximadamente 1.000 trasplantes de SCU realizados hasta la fecha (Kurtzberg y cols., 1996; Gluckman y cols., 1997; Rubinstein y cols., 1998; Gluckman y cols., 1998) ha permitido poner en contexto las perspectivas de este tipo de trasplante y definir cada vez mejor el lugar que ocupa la SCU en comparación con otras fuentes de células progenitoras hematopoyéticas. Del mismo modo, el conocimiento adquirido sobre el potencial hematopoyético y los requerimientos mínimos de la SCU para su consideración como producto de trasplante, están siendo elementos básicos para definir los criterios de estandarización y control de calidad de los bancos de SCU, imprescindibles para que las unidades procedentes de distintos bancos sean suficientemente homogéneas y garanticen la máxima seguridad en los eventuales receptores de trasplante. Esta optimización metodológica resulta, por tanto, esencial para mejorar los programas de bancos de SCU ya existentes y servir de referencia obligada para los que se prevean desarrollar en el futuro.

Los resultados clínicos preliminares sobre el trasplante no relacionado de SCU (Kurtzberg y cols., 1996; Wagner y cols., 1996) sugirieron que la SCU de donantes no emparentados, procesada y almacenada en bancos de SCU, contenía un número de células *stem* y células progenitoras suficiente para reconstituir el sistema hematopoyético en niños y adultos jóvenes, con un riesgo de EICH aguda inferior al anticipado. Estas observaciones propiciaron el inicio de una serie de estudios por parte de numerosos grupos interesados en conocer en profundidad las características biológicas de los progenitores hematopoyéticos primitivos de SCU, así como también del sistema inmune neonatal. Ontogénicamente, la hematopoyesis se inicia durante los primeros estadios del desarrollo embrionario en la pared ventral de la aorta dorsal y en el saco vitelino (Tavian y cols., 1996). Tras una breve fase hepática, las células primitivas hematopoyéticas migran hacia los espacios de la médula ósea al final del segundo trimestre de la gestación, en donde permanecen casi de manera exclusiva durante la vida adulta

(Moore y Metcalf, 1970). No obstante, y en contraste con esta restricción medular de la hematopoyesis en los individuos adultos, es bien sabido desde hace años que la SCU y la sangre neonatal contienen células progenitoras hematopoyéticas en una proporción elevada. Por ejemplo, la frecuencia de células progenitoras de estirpe granulocito-macrofágica (CFU-GM) es igual o superior a la de MO adulta (Knudtzon, 1974; Gabutti y cols., 1975; Broxmeyer y cols., 1989; Broxmeyer y cols., 1992). Estos progenitores, sin embargo, abandonan abruptamente la circulación neonatal a las pocas horas del nacimiento (Broxmeyer y cols., 1989), reduciéndose la frecuencia de los mismos en este corto intervalo hasta los niveles difícilmente detectables en condiciones basales en sangre periférica de individuos adultos.

A continuación se describe el estado actual del conocimiento sobre las propiedades hematopoyéticas de las células de sangre de cordón umbilical y las características del sistema inmune neonatal, así como los resultados obtenidos en las series más recientes de trasplante de SCU. Finalmente, se discuten cuestiones relacionadas con la estandarización metodológica y las técnicas de procesamiento dentro de los programas de bancos de SCU, cuestiones que en conjunto han dado lugar al planteamiento y realización del estudio que se propone en esta tesis doctoral.

1.1.- Antecedentes históricos.

Hasta mediados de los años 80, la SCU se consideraba generalmente como un material de desecho después de tomar las muestras pertinentes para la realización de las pruebas rutinarias en el recién nacido. El primer trasplante de SCU se realizó en octubre de 1988 (Gluckman y cols., 1989), realizándose en los dos años siguientes un número muy escaso de trasplantes. Cuatro de los cinco primeros trasplantes de SCU se llevaron a cabo en pacientes con Anemia de Fanconi (Gluckman y cols., 1989; Broxmeyer y cols., 1990; Broxmeyer y cols., 1991; Kohli-Kumar y cols., 1993), mientras uno fue realizado para el tratamiento de una leucemia mielomonocítica crónica juvenil (Wagner y cols., 1992). La racionalidad de estos trasplantes de SCU procedente de hermanos HLA idénticos fue sustentada en estudios de laboratorio que sugerían que la SCU era una fuente potencial de células progenitoras hematopoyéticas trasplantables (Broxmeyer y cols., 1989; Broxmeyer y cols., 1992).

Desde los primeros trasplantes realizados con material obtenido de un hermano HLA compatible o con una disparidad antigénica (Gluckman y cols., 1989; Wagner y cols., 1992; Vilmer y cols., 1992; Bogdanic y cols., 1993; Kohli-Kumar y cols., 1993; Vowels y cols., 1993; Pahwa y cols., 1994; Brichard y cols., 1995; Issaragrisil y cols., 1995; Wagner y cols., 1995; Brichard y cols., 1996; Stary y cols., 1996; Zix-Kieffer y cols., 1996), el campo ha avanzado rápidamente hasta la utilización de células con más de una disparidad HLA (Kurtzberg y cols., 1994). Por su parte, los trasplantes de donantes no relacionados han llegado a un punto en el que superan en número a los trasplantes de donantes familiares (Kurtzberg y cols., 1996; Laporte y cols., 1996; Wagner y cols., 1996; Gluckman y cols., 1997; Rubinstein y cols., 1998). La celeridad con la que se ha adquirido esta experiencia clínica en trasplante no relacionado de SCU se debe al establecimiento de los bancos de SCU mencionados (Gluckman, 1994; Rubinstein y cols., 1993), siendo el de mayor entidad el banco ubicado en el New York Blood Center bajo la dirección del Dr. Pablo Rubinstein. La gran mayoría de trasplantes no relacionados de SCU realizados hasta la fecha han utilizado células de donaciones obtenidas en este banco (Kurtzberg y cols., 1996; Laporte y cols., 1996; Wagner y cols., 1996; Gluckman y cols., 1997; Rubinstein y cols., 1998;).

1.2.- Resultados clínicos del trasplante no relacionado de SCU.

Las dos series más numerosas analizadas en detalle han sido recopiladas por el Banco de SCU de New York (562 pacientes) (Rubinstein y cols., 1998) y el registro Eurocord-Cord Blood Transplant Group (318 pacientes) (Gluckman y cols., 1998). En ambos grupos, más del 80% de los trasplantes fueron realizados en niños. Aproximadamente dos terceras partes de los receptores padecían leucemia o linfoma, y un tercio de los pacientes leucémicos fueron trasplantados en fases avanzadas de la enfermedad. En ambas series, los trasplantes de SCU fueron realizados en un número muy amplio de hospitales de distintos países. Por esta razón, no es posible comparar el efecto de diferentes regímenes preparativos y profilácticos sobre el resultado del trasplante. En cuanto a los bancos de SCU que proporcionaron las unidades, en el primer estudio todas procedían de un único banco, mientras que en el segundo las unidades procedían de ocho bancos diferentes. En el 94% de los casos de Eurocord, las unidades fueron proporcionadas por los bancos de New York, Düsseldorf, Milán y Barcelona. Por último,

mientras los 562 receptores del estudio del Banco de New York fueron trasplantados con unidades de donantes no relacionados, los 318 pacientes de la serie Eurocord incluían 102 casos trasplantados con SCU de donantes familiares.

Los datos clínicos del estudio de New York han mostrado una relación significativa entre el tiempo de implante de granulocitos y plaquetas y la dosis celular infundida. A este respecto, cabe señalar una observación interesante en cuanto a la recuperación de plaquetas, que fue especialmente tardía en comparación con las series publicadas de trasplante de MO o SPM (Kernan y cols., 1993). Por otra parte, la frecuencia de eventos relacionados con el trasplante, definidos como muerte, reconstitución autóloga o segundo trasplante, mostró una correlación significativa con la dosis celular y con la edad y el diagnóstico del paciente, siendo mínima en receptores de hasta 2 años de edad y máxima en receptores con anemia aplásica severa. La incidencia de EICH aguda grado III-IV y EICH crónica fue 23% y 25%, respectivamente. Finalmente, la frecuencia de recidiva, que fue de un 26% al año del trasplante en pacientes con leucemia aguda, estaba significativamente relacionada con el estadio de la enfermedad. La estimación mediante curvas de Kaplan-Meier de la supervivencia libre de eventos a los 100 días fue del 49%.

Los 102 niños (72 con neoplasias malignas) de la serie Eurocord sometidos a trasplante no relacionado mostraron, de forma similar, tiempos prolongados de implante plaquetar. La incidencia de EICH aguda grado II-IV fue 37%. La supervivencia a los 2 años fue 32% en pacientes con neoplasias malignas y 70% en aquellos con inmunodeficiencias/enfermedades metabólicas. Cuando los pacientes fueron estratificados por diagnósticos, la supervivencia a un año fue 70%, 35% y 10% en receptores con errores innatos del metabolismo, neoplasias malignas, y anemia aplásica constitucional/adquirida, respectivamente. Los factores asociados con una mejor supervivencia fueron la serología negativa para citomegalovirus (CMV) antes del trasplante y la compatibilidad de grupo sanguíneo ABO. Estos datos pueden compararse con los obtenidos en 42 receptores adultos de trasplante no relacionado con neoplasias malignas, comunicados también por Eurocord, 67% de los cuales pertenecían a grupos de alto riesgo (definidos como una fase más avanzada que segunda remisión completa en pacientes con leucemia aguda, o primera fase crónica en leucemia mieloide crónica). Estos pacientes tuvieron

una probabilidad y velocidad de implante de neutrófilos y plaquetas similares a los receptores pediátricos. Sin embargo, presentaron una mayor incidencia de EICH y una menor supervivencia. En particular, la supervivencia a un año en pacientes adultos fue 36% y 7% en subgrupos de bajo y alto riesgo, respectivamente. Los factores favorables de supervivencia en pacientes adultos con neoplasias malignas en la serie Eurocord fueron el número de células nucleadas infundidas superior a $1 \times 10^7/\text{kg}$ de peso corporal y un estadio precoz de la enfermedad en el momento del trasplante.

El trasplante no relacionado de SCU en niños con leucemia aguda ha sido específicamente investigado por Locatelli y cols. (1999), quienes examinaron 40 pacientes con leucemia linfoblástica y 20 pacientes con leucemia mieloblástica registrados entre abril de 1990 y diciembre de 1997 en Eurocord. Este grupo de pacientes incluía 42 y 18 pacientes trasplantados en condiciones de bajo y alto riesgo, definidas como primera o segunda remisión completa y enfermedad más avanzada. La supervivencia libre de eventos a los 2 años estimada con curvas de Kaplan-Meier en estos dos grupos pronósticos fue 40% y 7%, respectivamente.

En resumen, los datos descritos por los investigadores del Banco de New York y del registro Eurocord-Cord Blood Transplant Group indican que los resultados del trasplante alogénico no relacionado de SCU están fuertemente condicionados por la dosis celular infundida, siendo más eficaz en niños que en adultos, además de ser muy dependientes del estadio de la enfermedad en el momento del trasplante. Ambos estudios han mostrado una menor frecuencia e intensidad de EICH, y un mayor tiempo de implante plaquetario en comparación con receptores de MO y SPM. Globalmente, la tasa de recidiva y la probabilidad de implante hematopoyético no han sido diferentes de las que cabría esperar en un grupo comparable de pacientes trasplantados con MO o SPM. Aunque los datos del Programa de New York parecen apoyar un efecto negativo de la incompatibilidad HLA entre donante y receptor, ésta no demostró tener ninguna asociación significativa con la supervivencia en la serie comunicada por Eurocord. Se necesitan, por tanto, estudios más amplios para poder obtener evidencias conclusivas en este aspecto concreto.

Si bien estos resultados preliminares muestran la potencialidad de la SCU en el tratamiento de diversas enfermedades, la información disponible no es aún suficiente para sentar indicaciones firmes del trasplante no relacionado de SCU como alternativa a otras fuentes de células progenitoras hematopoyéticas. En general, algunos datos publicados o presentados en foros científicos relevantes indican que el resultado del trasplante de SCU no es favorable en pacientes trasplantados en condiciones de alto riesgo, particularmente cuando la dosis de células nucleadas por kg de peso es inferior a 2×10^7 . Hasta que no se disponga de información más precisa, la recomendación más extendida es solicitar una búsqueda simultánea en los registros de donantes voluntarios de MO y en los bancos de SCU, adoptando la decisión final en función del grado de compatibilidad HLA, la disponibilidad del donante, la urgencia del trasplante, el número de células presentes en la SCU, la edad, sexo y número de embarazos del donante y el estado serológico para CMV (Gluckman y cols., 1998). Sin embargo, a medida que los trasplantes de SCU no solo aumenten en número, sino que además se efectúen en una fase evolutiva más temprana de la enfermedad y se pueda comparar así la eficacia de las distintas fuentes de trasplante, cabe esperar que termine evidenciándose la superioridad clínica que, con respecto a MO y SPM, previsiblemente demostrará la SCU dadas las peculiares características hematopoyéticas e inmunológicas que poseen las células sanguíneas neonatales.

1.3.- Características biológicas de la SCU.

La SCU tiene muchas ventajas teóricas sobre las células de MO y SPM debido a la relativa inmadurez que presentan los sistemas hematopoyético e inmunitario durante el periodo perinatal. En comparación con las células hematopoyéticas adultas, los progenitores hematopoyéticos de SCU tienen una mayor proporción de células *stem* más primitivas con capacidad de repoblación *in vivo* a largo plazo. Estas propiedades confieren una ventaja proliferativa a las células hematopoyéticas de SCU que debería compensar la limitación en el número de células trasplantadas y, en consecuencia, ser suficiente para reconstituir la hematopoyesis después de un tratamiento mieloablativo en niños y también en adultos.

Por otro lado, dada la relativa inmadurez de los linfocitos de SCU, es razonable predecir una menor frecuencia e intensidad de EICH en los trasplantes de SCU que en los de células *stem*

hematopoyéticas de donantes adultos, los cuales contienen un mayor número de células T activadas. Estas características inmunológicas deberían conducir al establecimiento de criterios menos estrictos de compatibilidad HLA entre donante y receptor en los trasplantes de SCU.

1.3.1.- Propiedades inmunológicas de las células de SCU.

La enfermedad injerto contra huésped es una consecuencia de la activación de células T derivadas del donante que reconocen aloantígenos específicos del receptor. El síndrome clínico es la culminación de una serie compleja de eventos que implican no solo la estimulación linfocitaria vía receptor de la célula T y diversas moléculas coestimuladoras, sino también la liberación de citocinas proinflamatorias. La proliferación clonal de células T del donante, la activación de otras células efectoras (células T citotóxicas, células *natural killer* [NK]) y la secreción de diversas citocinas conduce al daño tisular y, subsecuentemente, a las manifestaciones de la enfermedad. La observación clínica de que la EICH es menos frecuente y menos severa, y que los requerimientos de compatibilidad HLA pueden ser menores en los receptores de SCU que en los receptores de otras fuentes de células progenitoras hematopoyéticas, ha propiciado numerosos estudios con un objetivo común: intentar explicar los mecanismos por los que el sistema inmunitario neonatal no es capaz de generar una respuesta de la magnitud con la que responden normalmente las células adultas.

La principal conclusión de estos estudios indica que los linfocitos de SCU tienen un fenotipo *naive* (Madrigal y cols., 1997; Cohen y cols., 1998), y que funcionalmente estos linfocitos T inmaduros son muy susceptibles a la inducción de tolerancia inmunológica (Roncarolo y cols., 1996). Según describen estos investigadores, la activación repetida *in vitro* de células T de SCU con aloantígenos da lugar a la incapacidad de proliferación o de producción de citocinas cuando estas células son estimuladas de nuevo con el mismo antígeno. A pesar de estos hallazgos de laboratorio, aún no ha podido determinarse positivamente que estas propiedades sean responsables de la menor capacidad de las células de SCU para generar EICH. Un mecanismo que resulta especialmente atractivo para explicar la menor frecuencia y severidad de EICH podría consistir en la expresión y producción disminuida de interleucina-12 (IL-12),

una citocina crítica en la regulación de las funciones T y NK, en células activadas de SCU en comparación con sangre periférica del adulto (SPA) (Lee y cols., 1996).

No obstante las diferencias encontradas entre células fetales y adultas, existen dos lagunas importantes que impiden extraer conclusiones firmes a partir de estos datos. En primer lugar, el hecho de que la mayoría de los trasplantes de SCU hayan sido realizados en niños, cuando es bien conocido que los pacientes jóvenes pueden tolerar mayor grado de incompatibilidad HLA que los adultos. Además, los estudios que revelan una función alterada de los linfocitos de SCU han sido realizados comparando células mononucleadas de SCU y SPA (Cohen y cols., 1998), cuando hubiese sido probablemente más relevante un análisis comparativo entre SCU y MO al tratarse de las dos fuentes de trasplante más habituales. En este sentido, existen algunos estudios de interés que describen una capacidad citotóxica aumentada en SCU en comparación con MO (Gardiner y cols., 1998). Este aspecto puede tener un impacto significativo en el resultado del TPH, al sugerir que la SCU podría poseer un mayor potencial de actividad injerto contra leucemia (ICL).

1.3.2.- Frecuencia de células progenitoras hematopoyéticas en SCU.

En comparación con MO de individuos adultos, la SCU contiene una mayor proporción de progenitores clonogénicos primitivos (Hows y cols., 1992) y una frecuencia ocho veces mayor de progenitores clonogénicos de alto potencial proliferativo (CFU-HPP), que son células progenitoras capaces de dar lugar a colonias de gran tamaño (Lu y cols., 1993). Ambas fuentes de células *stem* hematopoyéticas muestran frecuencias similares de células iniciadoras de cultivos a largo plazo (LTC-IC), una población de progenitores muy precoces incapaces de formar colonias en cultivos semisólidos, pero capaces de dar lugar a células formadoras de colonias después de varias semanas en cultivos a largo plazo tipo Dexter (Pettengell y cols., 1994).

1.3.3.- Fenotipo de las células progenitoras hematopoyéticas en SCU.

El antígeno CD34, una glicoproteína de membrana, es considerado desde hace ya varios años como un marcador bien definido de células progenitoras hematopoyéticas (Civin y cols., 1984); de hecho, sigue siendo aceptado como tal en la actualidad, si bien datos recientes sugieren que una pequeña subpoblación de células que no lo expresan puede comprender precursores aún más precoces (Huss, 1998). La frecuencia de células CD34⁺ es 0.2-1% y 1-3% de las células nucleadas en SCU y MO adulta, respectivamente (Kinniburgh y Russell, 1993). Dentro de la población CD34⁺, las células sin el antígeno CD38 (CD34⁺/CD38⁻) representan un subgrupo de células más primitivas cuya proporción, por el contrario, es superior en SCU que en MO adulta (aproximadamente 4% vs 1%, respectivamente) (Hao y cols., 1995).

Estas células primitivas muestran en SCU y en MO un fenotipo similar (CD34⁺, CD38⁻, CD45RA^{low}, CD71^{low}). Además, la mayoría de ellas expresan Thy-1 (CD90, un antígeno inhibidor de la proliferación celular), c-kit (CD117, el receptor para *stem cell factor*, SCF), y FLT3 (CD135, el receptor del factor de crecimiento de células primitivas *FLT3-ligand*). También se caracterizan por una mayor expresión de p-glicoproteína respecto a células más diferenciadas, como refleja la menor retención citoplasmática de rodamina (Rho). La expresión de HLA-DR en LTC-IC es diferente en SCU respecto a MO adulta, siendo detectable solo en los progenitores primitivos de SCU (Traycoff y cols., 1994a).

En resumen, la evidencia actual indica que las células progenitoras hematopoyéticas más primitivas presentes en SCU y MO adulta comparten un mismo fenotipo: CD34⁺ 38⁻ 45RA^{low} 71^{low} Thy-1⁺ c-kit^{low} Rho^{low}. La frecuencia de células con este fenotipo en SCU es aproximadamente 1 en 30.000 células nucleadas. Globalmente, la proporción de células progenitoras inmaduras definidas de esta forma parece ser mayor en SCU que en MO adulta (Mayani y Lansdorp, 1998).

1.3.4.- Diferencias funcionales *in vitro* e *in vivo* entre células progenitoras hematopoyéticas de SCU y MO adulta.

Una peculiaridad importante que muestran las células progenitoras hematopoyéticas de SCU es el mayor potencial de proliferación/expansión *in vitro* en comparación con MO adulta. Esta característica, que puede ser relevante para los programas de expansión *ex vivo*, cuya finalidad es aumentar las posibilidades de trasplante de la SCU en pacientes adultos o con gran tamaño corporal (ver más adelante), se ha relacionado con una serie de diferencias biológicas: i) tránsito rápido en fase G₀/G₁ del ciclo celular y producción autocrina de citocinas (Traycoff y cols., 1994b); ii) presencia de telómeros más largos (Vaziri y cols., 1994); y iii) menor sensibilidad a algunos inhibidores hematopoyéticos, tales como el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), proteína inflamatoria macrofágica-1 α (MIP-1 α) e interferón- α (IFN- α) (Hahn y cols., 1994).

Las diferencias funcionales *in vivo* de las células progenitoras hematopoyéticas de SCU versus MO adulta han sido analizadas principalmente en modelos animales, incluyendo el ratón SCID/NOD y la oveja fetal, y también en procedimientos de trasplante/transferencia genética. En comparación con MO adulta, las células progenitoras de SCU muestran un potencial superior de implante y repoblación hematopoyética. Este mayor potencial se refleja en la capacidad de injertar y repoblar el tejido hematopoyético de ratón sin necesidad de administrar citocinas postrasplante (Vormoor y cols., 1994), las cuales, sin embargo, son necesarias para mejorar sustancialmente el implante hematopoyético cuando se trasplanta MO adulta (Lapidot y cols., 1992). Por otro lado, estudios comparativos han demostrado que la SCU contiene aproximadamente una célula repobladora de SCID (CRS, células capaces de injertar la médula ósea de ratones SCID) por millón de células nucleadas, comparada con 1 en 3 millones y 1 en 6 millones en MO y SPM, respectivamente (Wang y cols., 1997). Una observación de gran relevancia para la reconstitución hematopoyética a largo plazo, es la capacidad que tienen las células de MO de receptores murinos primarios de SCU de injertar en receptores secundarios (Hogan y cols., 1997).

A pesar de su utilidad, el modelo murino SCID/NOD adolece de algunas limitaciones que impiden realizar observaciones prolongadas o estudiar la reconstitución completa hematopoyética e inmunológica postrasplante, ya que la proliferación y diferenciación de las células del donante pueden verse restringidas en animales genéticamente deficientes (Greiner y cols., 1998). Algunas de estas limitaciones podrían superarse con el modelo de oveja fetal desarrollado por Zanjani y cols. (1992), quienes lo utilizaron para demostrar la capacidad de implante y repoblación a largo plazo de células CD34⁺ purificadas de SCU. Según estos autores, en el xenotrasplante humano/ovino las células *stem* hematopoyéticas colonizan y persisten en médula ósea durante varios años, son capaces de diferenciarse en múltiple linajes, mantienen su capacidad de respuesta a citocinas humanas y retienen la capacidad de implante/diferenciación en receptores secundarios (Zanjani y cols., 1996). Además, un aspecto del modelo de oveja que lo hace único es su gran tamaño, lo cual permite evaluar de forma repetida la actividad hematopoyética en el mismo animal quimérico durante un periodo de tiempo prolongado. Desgraciadamente, este hecho constituye el mayor impedimento para que este sistema de hematopoyesis *in vivo* pueda ser utilizado de una forma más extendida.

En lo que se refiere a manipulación genética, algunos datos sugieren que las células de SCU pueden ser más apropiadas para realizar ensayos de transferencia genética que las células de MO. Estudios realizados por Moritz y cols. (1993) demostraron que la eficiencia de transferencia de los genes adenosina deaminasa y resistencia a neomicina fue aproximadamente el doble en células progenitoras primitivas de SCU que en células de MO. Aunque la experiencia clínica basada en estos procedimientos es todavía muy preliminar, de momento se ha podido comprobar la capacidad de estas células de SCU genéticamente modificadas de injertar en neonatos con deficiencia de adenosina deaminasa (Kohn y cols., 1995).

En resumen, los datos actualmente disponibles muestran que la SCU contiene no solo una mayor proporción de células progenitoras hematopoyéticas primitivas sino que, además, éstas tienen un mayor potencial de proliferación y expansión en comparación con la MO de adulto. La evidencia actual indica que las células progenitoras de SCU poseen una mayor capacidad para injertar y mantener la hematopoyesis *in vivo* y son más adecuadas para manipulación y terapia genética que las células hematopoyéticas procedentes de otras fuentes.

1.3.5.- Expansión *ex vivo* de SCU.

Debido a las limitaciones derivadas del escaso número de células presentes en una unidad de SCU, se han desarrollado un número de protocolos de expansión *ex vivo* de células progenitoras hematopoyéticas de SCU (Denning-Kendall y cols., 1998). Algunos protocolos han sido diseñados no solo para aumentar el número de células *stem* primitivas, sino también para promover algún grado de compromiso hacia linaje megacariocítico, con la esperanza de poder así acortar el tiempo de prendimiento de las plaquetas.

Kohler y cols. (1999) han investigado las condiciones óptimas para la expansión *ex vivo* de SCU en lo que se refiere a la influencia del enriquecimiento de células progenitoras, al papel de las capas alimentadoras (*feeder-layers*), a las combinaciones de citocinas y al modo de agitación del frasco de cultivo. Estos autores describieron que los resultados óptimos fueron obtenidos con una combinación de SCF, FLT3-ligand e IL-3 y que la adición de trombopoyetina (TPO) mejoraba los resultados de la expansión. Además, encontraron que una rotación continua de los frascos de cultivo no disminuía la tasa de expansión. Collins y cols. (1998) han descrito expansiones óptimas de células mononucleadas de SCU cultivadas en frascos giratorios en medio libre de suero, condiciones diseñadas en perspectiva de una aplicación clínica futura. Un sistema parecido al anterior, consistente en un cultivo a gran escala basado también en el empleo de frascos giratorios, ha sido puesto a punto por Kogler y cols. (1998a), quienes describieron una expansión *ex vivo* de LTC-IC de 8 veces tras 7-14 días de cultivo en presencia de FLT3-ligand, SCF e IL-3. Finalmente, los efectos sobre subpoblaciones celulares definidas de SCU de una exposición de 7 días a IL-3, IL-6, CSF-G, SCF y FLT3-ligand, en la presencia de 10% de suero bovino fetal, fueron estudiados por Rice y cols. (1999). Basándose en los resultados de este estudio, estos autores concluyeron que las células más primitivas CD34⁺CD38⁻, CD34⁺Thy-1⁺ y CD34⁺Rh123⁻ tienen una respuesta proliferativa limitada y que su actividad de célula *stem* no se ve incrementada por acción de las citocinas, siendo las poblaciones celulares de precursores comprometidos las que dieron lugar a la expansión celular observada al final del cultivo.

Piacibello y cols. (1999) investigaron la expansión de SCU durante intervalos muy prolongados, siendo capaces de obtener amplificaciones extensas e inducir autorenovación de

células *stem* primitivas en un sistema *in vitro* apropiado para expandir más de 200.000 veces LTC-IC de SCU tras 20 semanas de cultivo líquido en presencia de TPO y FLT3-ligand. El efecto sinérgico de IL-6 e IL-11, citocinas que intervienen en la maduración del linaje megacariocítico, fue igualmente investigado en cultivos prolongados de SCU por Lazzari y cols. (1998), quienes identificaron como condiciones óptimas para la expansión de células CD34⁺ purificadas de SCU la incubación en medio libre de suero y de estroma, y la presencia en el cultivo de TPO, FLT3-ligand, IL-6 e IL-11.

La disparidad de resultados observada en estos estudios indica que no existe por el momento un consenso universal sobre el sistema más conveniente y adecuado para la expansión *ex vivo* de células progenitoras hematopoyéticas de SCU, y que la investigación en este campo está todavía en una fase muy preliminar. Del mismo modo, en lo que respecta al potencial de repoblación *in vivo* de estas células, junto a una serie de estudios preclínicos que demuestran la capacidad de prendimiento de SCU expandida en animales inmunodeficientes como el SCID/NOD (Lazzari y cols., 1998; Stevenson y cols., 1998; Piacibello y cols., 1999), existe una cierta preocupación a raíz de los hallazgos recientes de Güenechea y cols. (1999), quienes describen un retraso en la repoblación a corto plazo de ratones SCID/NOD trasplantados con SCU expandida *ex vivo* durante 6 días en presencia de IL-3, IL-6 y SCF, en comparación con la repoblación obtenida con SCU fresca. Es posible que las conclusiones divergentes de algunos estudios se deriven básicamente de la utilización de diferentes condiciones de cultivo y combinaciones de citocinas en las expansiones de SCU.

Algunos productos expandidos ya han sido utilizados clínicamente, aunque solo en protocolos investigacionales (Jaroscak y cols., 1998; Shpall y cols., 1998; Stiff y cols., 1998). En algunos casos, las células infundidas han sido cultivadas en un sistema cerrado y automatizado, cuyo diseño responde a normas de buena práctica de manufacturación (GMP) que facilitan la utilización clínica de los productos expandidos (Koller y cols., 1998). Estos estudios fueron planteados inicialmente para evaluar la seguridad y tolerancia de la administración de células expandidas, que en general no se acompaña de incidencias relevantes. Sin embargo, a pesar de que los resultados preliminares son alentadores, se requieren evaluaciones a más largo

plazo de los receptores de SCU sometida a expansión *ex vivo* antes de que puedan extraerse conclusiones firmes sobre el impacto de esta nueva forma de trasplante.

2.- PROGRAMAS DE BANCOS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL.

Como consecuencia de la experiencia clínica en trasplantes de SCU, claramente positiva desde un primer momento, se han desarrollado en diferentes países un número relativamente amplio de bancos de SCU distribuidos por todo el mundo, y otros muchos están siendo contemplados en la actualidad. La actividad de un banco de SCU comprende la selección de los donantes, la recogida, caracterización y criopreservación de la SCU, su almacenamiento en condiciones apropiadas para mantener la viabilidad celular de forma duradera, y la búsqueda y envío de unidades compatibles para trasplante. La localización de posibles unidades de SCU requiere que los equipos de trasplante sean capaces de acceder fácilmente a grandes inventarios, sin tener que multiplicar la búsqueda en distintos centros. Al mismo tiempo, las unidades de SCU trasplantadas deberían cumplir con niveles óptimos de calidad preestablecidos, independientemente de la ubicación del banco proveedor. Estos criterios de accesibilidad y seguridad, objeto de una demanda cada vez mayor por parte de los centros de trasplante, y el número creciente de bancos operativos de SCU, determinan últimamente la necesidad de implementar, en estos últimos, estándares y sistemas bien definidos que aseguren su calidad, preferiblemente bajo la regulación de agencias sanitarias y/o sociedades científicas internacionales. Los elementos claves de este sistema de calidad consisten en el empleo de normas GMP en el procesamiento de la SCU, la detección eficiente de enfermedades potencialmente transmisibles y, especialmente, el desarrollo de estándares específicos.

Aunque está claro que la SCU es una fuente alternativa de células *stem* hematopoyéticas para trasplante, todavía nos encontramos en una fase de aprendizaje. Del mismo modo que las características de la SCU pueden influir en la práctica clínica, los resultados de los trasplantes pueden influir en los métodos de procesamiento de la SCU y en la caracterización del potencial de trasplante. Por eso, el desarrollo de estándares para el procesamiento de SCU y la determinación del rango de aplicaciones potenciales de esta fuente de células progenitoras hematopoyéticas exigen la definición previa de una serie de aspectos relevantes para el funcionamiento óptimo de los Bancos de SCU, entre los que deben incluirse: i) las estrategias para una donación consentida, confidencial, sin riesgo para la madre o el recién nacido, y segura

para los eventuales receptores; ii) la elaboración y validación de procedimientos operativos para la obtención, caracterización hematopoyética, procesamiento, criopreservación y descongelación de SCU, así como también para la determinación a partir de DNA del tipaje HLA de clase I y clase II mediante técnicas moleculares de alta resolución; y iii) los criterios de validación de las unidades procesadas de acuerdo a una serie de parámetros básicos de celularidad y esterilidad.

El objetivo de este esfuerzo de estandarización, al estar todas las unidades de SCU procesadas bajo una uniformidad de criterio, y estar suficientemente caracterizadas en cuanto al contenido de progenitores hematopoyéticos (células y subpoblaciones CD34⁺, ensayos clonogénicos) y al tipaje HLA (determinación de los antígenos de clase I y clase II por alta resolución), es poder evaluar de forma más precisa el efecto de la dosis celular y de la disparidad HLA sobre el resultado del trasplante de SCU. En última instancia, se persigue constatar si la SCU es una fuente suficiente de células *stem* hematopoyéticas en todos los pacientes o si, por el contrario, tiene que limitarse su aplicación a ciertos subgrupos.

2.1.- Procesamiento de SCU y su influencia en los resultados clínicos de trasplante de SCU.

Los diferentes métodos de obtención de SCU que han sido propuestos para optimizar el volumen de recogida y reducir los riesgos de contaminación microbiana, consiguen de manera irregular estos objetivos (Turner y cols., 1992; Traineau y cols., 1993; Harris y cols., 1994). Aunque ninguno de ellos ha demostrado ser sustancialmente mejor que otro, la recogida de SCU en un frasco abierto mediante la sección del cordón umbilical prácticamente se ha abandonado debido al elevado potencial de contaminación bacteriana. Por el contrario, los sistemas cerrados que utilizan catéteres y agujas de venopunción, si bien técnicamente más complejos, se asocian con menores índices de contaminación, una vez que el personal responsable de la recogida adquiere el entrenamiento necesario.

Respecto a los procedimientos de separación celular, diferentes métodos han sido optimizados recientemente con objeto de disminuir la toxicidad asociada con la reinfusión de dimetilsulfóxido (DMSO) o la incompatibilidad ABO, así como para reducir el volumen de las unidades de SCU y, por tanto, el espacio requerido en los bancos de SCU para su

almacenamiento (Broxmeyer y cols., 1989; Harris y cols., 1994; Bertolini y cols., 1995; Rubinstein y cols., 1995). Mientras que los primeros estudios mostraron una pérdida significativa de células progenitoras durante la separación de SCU, una serie de estudios realizados con posterioridad han descrito tasas de recuperación celular en torno al 90%. En la actualidad existe la confirmación de que la separación de SCU es clínicamente aplicable, sin haberse notado efectos deletéreos en la recuperación hematopoyética ni en la probabilidad de prendimiento (Pahwa y cols., 1994; Rubinstein y cols., 1998).

El procedimiento de descongelación de SCU también ha sido recientemente modificado en base a las sugerencias de Rubinstein y cols. (1995). Con el método propuesto por estos autores, se consigue recuperar mayor cantidad de progenitores hematopoyéticos en las unidades así procesadas. Además, la utilización de este procedimiento en pacientes sometidos a trasplante de SCU se sigue de una recuperación hematológica más rápida que en aquellos en los que la SCU reinfundida fue descongelada por métodos convencionales (Kurtzberg y cols., 1996).

2.2.- Implicaciones sobre la actividad de los Bancos de SCU derivadas de la experiencia en trasplante de SCU.

La consideración de la SCU como una fuente apropiada de células *stem* hematopoyéticas debe estar fundamentada en lo que se conoce y se desconoce de ésta y otras fuentes de trasplante. En base a los datos actualmente disponibles sobre la SCU, se pueden realizar las siguientes afirmaciones:

1. La SCU contiene un número suficiente de células *stem* y células progenitoras para asegurar el implante hematopoyético en la mayoría de pacientes con menos de 50 kg de peso.
2. La obtención de SCU no supone ningún riesgo para la madre ni para el recién nacido.
3. El almacenamiento en bancos de SCU elimina la atrición observada en todos los registros de donantes voluntarios de médula ósea.
4. La contaminación por citomegalovirus o por virus de Epstein-Barr es muy infrecuente.
5. La SCU puede producir EICH severa.

Además, los datos clínicos existentes permiten sugerir ciertas características adicionales, si bien se requieren estudios más extensos que confirmen definitivamente estas propiedades de la SCU:

1. El trasplante de SCU parece asociarse con una tasa de EICH aguda inferior a la del trasplante de MO.
2. La disponibilidad en bancos de unidades criopreservadas de SCU permite acortar el intervalo entre el inicio de la búsqueda y la recepción del producto de trasplante en cerca de un mes, eliminándose los retrasos e incertidumbres que complican la obtención de MO.
3. La donación dirigida debería reducir el desequilibrio de representación de las minorías étnicas y raciales en los bancos de SCU.

Por último, la carencia de información clínica pertinente impide todavía dar respuesta a cuestiones tan importantes como las planteadas en los puntos siguientes:

1. ¿Es suficiente el contenido de células *stem* de la SCU para reconstituir la hematopoyesis en receptores adultos de gran tamaño corporal?
2. ¿Se asocia el trasplante de SCU con un riesgo de recidiva igualmente reducido como se observa en el trasplante no relacionado de MO adulta?
3. ¿Se producirá un aumento del número de trasplantes en pacientes de minorías étnicas o raciales?

Todas estas consideraciones serán de gran ayuda para precisar cada vez mejor el espacio que la SCU ocupa respecto a MO y SPM como fuente de células *stem* hematopoyéticas. Pero además, desde un punto de vista práctico, constituyen las bases para indicar a los bancos de SCU un conjunto de recomendaciones que han de mejorar previsiblemente los resultados clínicos del trasplante de SCU.

2.2.1.- Contenido celular de las unidades de SCU.

Así, una de las cuestiones clave acerca del uso general de SCU en el trasplante alogénico de células *stem* hematopoyéticas ha sido la preocupación constante respecto al potencial de implante de una única unidad de SCU en pacientes de todas las condiciones hematopoyéticas y de todos los pesos. Los resultados hasta ahora publicados demuestran que un número elevado de células nucleadas (CN) infundidas es un buen factor pronóstico de implante hematopoyético y de supervivencia. En la serie Eurocord (Gluckman y cols., 1998), la media de CN en las unidades de SCU utilizadas para trasplante relacionado y no relacionado fue 11×10^8 (extremos: 0.13-58). En los trasplantes no relacionados, los pacientes que recibieron menos de 3.7×10^7 CN/kg tuvieron un tiempo medio hasta $\geq 500/\mu\text{l}$ neutrófilos de 34 días (extremos: 18 a 48 días) y hasta $\geq 20.000/\mu\text{l}$ plaquetas de 134 días (extremos: 30 a 180 días), mientras que en los pacientes que recibieron un dosis celular superior el tiempo de recuperación fue respectivamente 25 días (extremos: 10 a 56 días) y 47 días (extremos: 9 a 85 días). En adultos, ninguno de los pacientes que recibieron menos de 1×10^7 CN/kg sobrevivieron. Los pacientes que recibieron menos de 2×10^7 CN/kg tuvieron una probabilidad del 69% y 49% para alcanzar $\geq 500/\mu\text{l}$ neutrófilos y $\geq 20.000/\mu\text{l}$ plaquetas a día 60, respectivamente.

Estos resultados muestran que la dosis celular infundida determina tanto la probabilidad de implante como la velocidad de recuperación hematológica. Es interesante destacar que el número de células infundidas es un orden de magnitud inferior al de un trasplante alogénico estándar de MO y 50-100 veces inferior al de un trasplante estándar de SPM. En consecuencia, el número de células infundidas es considerablemente menor que la dosis recomendada para trasplante no relacionado de MO (Sierra y cols., 1997), lo cual apoyaría la hipótesis de que las células de SCU tienen una ventaja proliferativa selectiva en comparación con MO adulta.

Con el fin de incrementar la probabilidad y velocidad de implante hematopoyético en los trasplantes de SCU se han propuesto diferentes alternativas, siendo una de ellas el uso de factores de crecimiento tales como CSF-G, SCF o TPO. En este momento, aún no se ha demostrado ningún beneficio derivado de la administración de estos factores, necesitándose

claramente mayor investigación en este campo. Otra aproximación, ya discutida en el apartado anterior, podría consistir en la expansión *ex vivo* de progenitores de SCU para mejorar el implante a corto plazo. Una tercera línea de investigación contempla la posibilidad de emplear varias unidades de SCU para aumentar el número de células *stem* infundidas. Esto implica cuestiones básicas sobre la reactividad inmunológica de células de SCU trasplantadas provenientes de fuentes HLA no idénticas, y su capacidad de reaccionar con el huésped. A la espera de que todas estas propuestas demuestren su verdadero alcance terapéutico, la importancia de la dosis celular es ya un dato suficiente para recomendar a los bancos de SCU la obtención del mayor número de células mediante procedimientos óptimos de recogida de SCU, y la selección del mejor método de separación celular y reducción de volumen, de forma que las unidades disponibles de SCU sean de la máxima riqueza celular.

2.2.2.- Tipaje HLA de clase I y clase II de alta resolución.

La inmadurez inmunológica de las células de SCU podría ser responsable de la menor incidencia y severidad de EICH aguda, incluso en situaciones de incompatibilidad HLA. Por el momento, no hay ningún estudio de casos y controles que compare la incidencia de EICH de acuerdo con la naturaleza de las células *stem* trasplantadas; no obstante, algunas evidencias sugieren que dicha incidencia puede estar reducida tras el trasplante de SCU. En las series publicadas, la EICH fue menos severa y la incidencia de EICH crónica fue menor que en el trasplante de MO. Estos hallazgos merecen ser destacados, teniendo en cuenta que se trata de trasplantes altamente incompatibles sin depleción de células T. En un estudio cooperativo IBMRT-Eurocord, se comparó la incidencia de EICH aguda y crónica en niños que recibieron bien un trasplante de SCU, bien un trasplante de MO de un hermano HLA idéntico. En análisis univariante y multivariante, la incidencia tanto de EICH aguda como de EICH crónica fue significativamente inferior en el trasplante de SCU: 15% vs. 24%, y 6% vs. 16%, respectivamente (Gluckman y cols., 1998).

El análisis de los trasplantes no relacionados de SCU es más complicado, debido a la presencia en la mayoría de los casos de una o más disparidades HLA, así como a la heterogeneidad en las técnicas de tipaje HLA empleadas. En trasplantes no relacionados de MO,

se ha demostrado que las incompatibilidades detectadas por tipaje HLA de alta resolución de clase I y clase II son predictivas de EICH y también de supervivencia (Scott y cols., 1998). Por ejemplo, en un estudio de trasplante no relacionado de MO sin depleción de células T en leucemia mieloide crónica, la incidencia global de EICH grado II-IV fue del 73%, con una estimación de EICH severa grado III-IV de un 21% en pacientes que recibieron un trasplante HLA idéntico, y de un 47% en los que recibieron un trasplante de MO incompatible (Hansen y cols., 1998). Estas cifras deben ser comparadas con la incidencia del 21% de EICH aguda grado II-IV, y un número reducido de EICH grado III-IV, observada en trasplante no relacionado de SCU incompatible.

Mientras que la incompatibilidad HLA en los trasplantes relacionados de SCU se asocia con un mayor riesgo de EICH aguda, no se ha encontrado ninguna correlación entre el número de disparidades HLA y la aparición de EICH en los trasplantes no relacionados. Esto podría deberse al hecho de que el tipaje de alta resolución solo se ha aplicado en la determinación de HLA-DRB1, lo que hace difícil la interpretación de los resultados. También podrían jugar algún papel diferencias menores en el sistema de histocompatibilidad. En consecuencia, será muy importante en el futuro estudiar todos los antígenos HLA de clase I y clase II utilizando técnicas moleculares de alta resolución, consideradas en la actualidad como los mejores métodos disponibles. El objetivo es adquirir el máximo de información para poder evaluar la trascendencia clínica de los diversos niveles de incompatibilidad HLA en los trasplantes no relacionados de SCU. El almacenamiento de células viables y de DNA de donantes y receptores para futuras pruebas es, asimismo, muy útil para este propósito.

2.2.3.- Actividad injerto contra leucemia (ICL) de la SCU.

Es bien sabido que las células T juegan un papel importante en la erradicación de células leucémicas, fundamentalmente en leucemia mieloide crónica. La constatación de este hecho proviene de dos observaciones clínicas básicas: el riesgo aumentado de recidiva tras un trasplante de MO deplecionada de células T, y la eficacia de las infusiones de linfocitos del donante para tratar recidivas postrasplante de MO. Dado que los linfocitos de SCU están disminuidos en número y son inmunológicamente inmaduros, cabe la posibilidad de que no

ejercen una función ICL como los linfocitos de MO adulta. De hecho, datos experimentales sugieren en realidad un cierto grado de impedimento funcional, si bien las células NK y T de SCU pueden ser inducidas mediante estimulación antigénica (Harris, 1995). En el contexto clínico de los trasplantes de SCU, en ausencia de estudios comparativos con otras fuentes de células *stem*, la actividad ICL es difícil de evaluar, puesto que el número de pacientes es aún limitado y el seguimiento demasiado corto. Sin embargo, una observación interesante la constituye el efecto ICL sin EICH de las infusiones de linfocitos del donante tras recidiva en receptores de trasplante familiar de SCU. Basándose en éste y otros datos adicionales que indican que la probabilidad de recidiva no está aumentada a pesar de un menor potencial de EICH, puede sugerirse que la SCU es capaz de generar una respuesta ICL eficaz. El estudio de los mecanismos responsables de este posible efecto inmune antitumoral en SCU será esencial para la identificación de las células efectoras con actividad ICL y, a su vez, comprobar si esta actividad está segregada respecto de las células efectoras con actividad EICH.

A la vista de toda la información acumulada hasta el momento, y que se ha descrito en los párrafos precedentes, se puede concluir que la sangre de cordón umbilical constituye una fuente alternativa de células progenitoras hematopoyéticas con algunas características distintivas que suponen, o más importantemente, pueden suponer en el futuro, una mejora de gran relevancia en el tratamiento de enfermedades malignas y no malignas cuya terapia estándar todavía descansa en el trasplante de progenitores hematopoyéticos de MO o SPM.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

A partir de lo expuesto en la introducción, resulta evidente la proyección que puede tener el Banco de SCU en el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas. No obstante, también se advierte de la complejidad de dicha tarea, puesto que para ello es estrictamente necesario, no solo optimizar los procedimientos más adecuados para procesar las unidades de SCU conforme a estándares de calidad aceptados a nivel nacional e internacional, sino también conocer en profundidad las características biológicas de la SCU y, en consecuencia, disponer de las técnicas apropiadas para su análisis.

El objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido la evaluación y estandarización de protocolos para la creación de un Banco de Sangre de Cordón Umbilical en el Hospital 12 de Octubre, donde el Doctorando lleva a cabo su labor asistencial como Médico Especialista en Hematología y Hemoterapia. Para ello, se plantearon dos objetivos concretos:

1. Caracterización de la SCU mediante estudio experimental de las propiedades hematopoyéticas e inmunológicas de la misma.
2. Puesta a punto de los procedimientos técnicos de obtención, fraccionamiento, criopreservación, almacenamiento y descongelación de las muestras de SCU para su validación como unidades trasplantables.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- MATERIALES.

1.1.- Impresos para la donación de SCU.

La hoja de información sobre la donación de sangre de cordón umbilical, el consentimiento informado para la donación voluntaria de sangre de cordón umbilical, el protocolo de obtención de sangre de cordón umbilical y la hoja de recogida de datos de fraccionamiento y criopreservación quedan recogidos en los Anexos I a IV, respectivamente.

1.2.- Material para la obtención de SCU.

Para la recolección de la SCU se utilizaron los sistemas de donación de sangre de bolsa doble de Terumo, con 63 ml de citrato-fosfato-dextrosa-adenina (CPD-A) como solución anticoagulante, cloruro sódico 0.9% de Baxter, sistemas de infusión de Sendal, heparina sin conservantes 1000 U/ml de Rovi, pinzas de Kocher, alcohol 70%, povidona yodada, gasas y guantes estériles.

1.3.- Material para el procesamiento y caracterización de SCU.

Las bolsas de transferencia de 400 ml, los adaptadores para toma de muestras y las bolsas de congelación de 750 ml y 50 ml fueron suministrados por Baxter; los frascos de cultivo aerobios y anaerobios por Organon; los tubos cónicos de polipropileno de 50 ml, los criotubos de 4.5 y 1.8 ml y las placas *multidishes* de 24 pocillos por Nunc.

1.4.- Reactivos para el procesamiento y caracterización de SCU.

Para el fraccionamiento de SCU se utilizaron los siguientes medios de separación celular: Ficoll-Paque densidad 1.077 g/ml de Pharmacia, Histopaque densidad 1.083 g/ml y metilcelulosa de Sigma, gelatina al 3.5% (Hemoce) de Behring y hidroxietil almidón al 6% (HES) de Grifols. La solución de metilcelulosa al 1% se preparó en medio Iscove's y se suplementó con L-glutamina, ambos de GIBCO BRL, y α -monotioglicerol de Sigma.

Los reactivos empleados para la congelación y descongelación de SCU fueron: medio 199 de GIBCO BRL, dimetilsulfóxido (DMSO) de Carlo Erba, suero bovino fetal (SBF) de Sera-Lab, dextrano 10% de Antibióticos Farma y albúmina humana 20% de Behring.

En la caracterización de la SCU por citometría de flujo, se emplearon anticuerpos monoclonales (AcMo) para el análisis de células progenitoras hematopoyéticas, células linfocitarias y detección intracelular de citocinas. Todos los AcMo fueron adquiridos de la casa comercial Becton Dickinson, excepto anti-CD7 y anti-CD69 que fueron adquiridos de CALTAG y Dako, respectivamente. La relación de AcMo utilizados en los distintos ensayos fenotípicos se detalla en la siguiente tabla:

Designación	Clon	Designación	Clon
CD3	Leu-4	CD45	GAP8.3
CD4	Leu-3a	CD45RA	Leu-18
CD5	Leu-1	CD45RO	Leu-45RO
CD7	6B-7	CD54 (ICAM-1)	Leu-54
CD8	Leu-2a	CD56	Leu-19
CD10	CALLA	CD57	Leu-7
CD11a (LFA-1)	11a	CD58 (LFA-3)	LFA-3
CD13	Leu-M7	CD61	Gp-IIIa
CD15	Leu-M1	CD117	c-kit
CD16	Leu-11c	HLA-DR	HLA-DR
CD19	Leu-12/SJ25-C1	TCR $\alpha\beta$	WT31
CD25	IL-2R	TCR $\gamma\delta$	TCR- $\gamma\delta$ -1
CD33	Leu-M9	CD69	FN50
CD34	HPCA-2	IL-2	IL-2
CD38	Leu-17	IL-4	IL-4
CD41	Gp-Ib	IFN- γ	IFN- γ
CD44 (HCAM)	Leu-44		

Otros reactivos empleados en los estudios de citometría de flujo fueron: solución de lisis FACS y solución de permeabilización FACS de Becton Dickinson; tampón PBS y medio RPMI de GIBCO BRL; forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), ionomicina, brefeldina y albúmina sérica bovina (BSA) de Sigma.

Para el análisis de viabilidad celular se utilizó azul tripán al 0.5% de Seromed. Por su parte, los ensayos clonogénicos fueron realizados en medio de cultivo MethoCult H4431 de Stem Cell Technologies, compuesto por Iscove's, metilcelulosa al 0.9%, SBF al 30%, BSA al 1%, 2-mercaptoethanol a 10^{-4} M y L-glutamina a 2 mM, suplementado con medio condicionado de leucocitos-agar al 10% y eritropoyetina humana recombinante a 3 U/ml.

1.5.- Muestras.

Las muestras de SCU se obtuvieron según el procedimiento que se describe más adelante. Las muestras de MO y SPA fueron obtenidas en heparina a partir de donantes adultos sanos. Las muestras de SPM se obtuvieron a partir de citaféresis realizadas en pacientes adultos que recibieron quimioterapia y CSF-G como tratamiento de movilización de células progenitoras hematopoyéticas.

2.- MÉTODOS.

2.1.- Selección de donantes de SCU.

La obtención de SCU fue realizada en neonatos sanos a término, nacidos de parto vaginal, siempre que no se apreciara ninguna de las siguientes circunstancias clínicas consideradas causas de exclusión para la donación: i) parto prematuro (menos de 32 semanas de gestación); ii) rotura de bolsa de líquido amniótico de más de 12 horas; iii) fiebre materna ($>38^{\circ}\text{C}$); iv) presencia de meconio en líquido amniótico; v) sufrimiento fetal; vi) inmunización materna eritrocitaria (anticuerpos irregulares en el suero de la madre); vii) anemia materna ($\text{Hb} < 10.5 \text{ g/dl}$); viii) enfermedad infecciosa transmisible (virus de la inmunodeficiencia humana [VIH], citomegalovirus [CMV], sífilis, hepatitis B, hepatitis C, toxoplasmosis, rubeola).

Una vez comprobado y anotado en las hojas de datos correspondientes (anexo III) que la madre/donante reunía todos los requisitos, fue requerida la firma del consentimiento informado para la donación voluntaria de SCU (anexos I y II) antes de proceder a su obtención. Toda la documentación relativa a la donación se identificó con etiquetas adhesivas en las que figuraban el nombre y apellidos de la madre, el número de historia clínica, la edad y los datos de domiciliación.

2.2.- Obtención de SCU.

Para preparar las bolsas de recogida a partir de los sistemas de donación de sangre, se transfirió una parte del contenido de CPD-A a la bolsa satélite dejando un volumen de 30 ml en la bolsa principal, y sellando el tubo conector entre ambas (la bolsa satélite se desecha). En esta operación, la esterilidad del sistema fue siempre preservada. Una vez preparadas, las bolsas se almacenaron en el paritorio a temperatura ambiente y protegidas de la luz.

En el momento de la donación, se identificaron dos bolsas de recogida (rotuladas como Fracción 1ª y Fracción 2ª) mediante etiquetas adhesivas con los datos de identificación de la

madre. Paralelamente, se preparó asépticamente una solución de 50 ml de cloruro sódico 0.9% con 5000 U de heparina (solución heparinizada de ClNa), y se conectó a un sistema de infusión.

2.2.1.- Placenta *intra utero* (Fracción 1ª).

Inmediatamente después del nacimiento (en menos de 15 segundos), el cordón umbilical fue pinzado a 5-7 cm del ombligo mediante dos pinzas de Kocher. Una vez seccionado, se procedió a esterilizar el cordón: inicialmente solo se utilizó povidona yodada para este fin; en una segunda fase, la esterilización se realizó con alcohol 70% y povidona yodada.

A continuación, se canuló la vena umbilical con la aguja de la bolsa de recogida rotulada como Fracción 1ª, y se dejó fluir la sangre por gravedad hasta que cesara el flujo. En ese momento, se procedió a retirar la aguja de la vena, cubrirla con su protección, y anudar fuertemente el sistema para evitar pérdidas de sangre. Esta primera fase de recogida se completó en menos de 5 minutos desde el momento del parto.

2.2.2.- Placenta *ex utero* (Fracción 2ª).

Tras el alumbramiento, se esterilizó la placenta en la zona de inserción del cordón, y se canalizaron la arteria y la vena umbilical con las agujas respectivas de los sistemas de la solución heparinizada de ClNa y de la bolsa rotulada como Fracción 2ª. Se colocaron en alto y en un plano inferior, respectivamente, con objeto de perfundir la placenta de forma arteriovenosa y recoger por gravedad la sangre placentaria. Al finalizar, se protegió el sistema de la segunda bolsa de recogida de igual forma a como se ha descrito para la primera, completándose el procedimiento de obtención en 15-20 minutos.

2.2.3.- Conservación de las unidades de SCU hasta el procesamiento.

Las bolsas de SCU fueron almacenadas a 4°C hasta su procesamiento al día siguiente, adjuntándose las hojas de recogida de datos y el consentimiento informado. El transporte al laboratorio se realizó a temperatura ambiente en un periodo inferior a 10 minutos, dada la

proximidad con la maternidad. Al ser recibidas en el Banco de SCU, las unidades fueron procesadas inmediatamente o, en su defecto, volvieron a conservarse a 4°C hasta el momento de su procesamiento.

2.3.- Procesamiento de las unidades de SCU.

A lo largo del procesamiento de la SCU, todas las manipulaciones se realizaron en cabina de flujo laminar y se adoptaron medidas básicas de asepsia.

2.3.1.- Identificación.

Todo el material biológico y documental de cada unidad de SCU se identificó de manera específica con la fecha, número de unidad de SCU (asignado consecutivamente) y código de unidad de SCU (compuesto por las tres primeras letras de los dos apellidos y las dos primeras letras del nombre de la madre). Esta identificación sirve para relacionar cada unidad de SCU con la madre y el recién nacido, las muestras testigo (ver más adelante) y toda la documentación de recogida de datos y resultados analíticos.

2.3.2.- Muestra de suero materno.

Cuando la unidad de SCU fue finalmente procesada para su almacenamiento en el Banco (y no para fines investigacionales; ver anexo I), se tomó una muestra de sangre materna y se remitieron al laboratorio de Microbiología 2.5 ml de suero (800 ×g, 10 min) para realizar serología viral (VIH 1/2, VHC, HBsAg y CMV) y parasitaria (Sífilis y Toxoplasma) por enzima-inmuno-análisis (EIA) o test de hemaglutinación; el resto fue congelado a -80°C en un criotubo de 1.8 ml debidamente identificado (muestra testigo-1: Suero Materno).

2.3.3.- Sangre de cordón umbilical.

Las dos fracciones de SCU fueron combinadas en una bolsa estéril de 400 ml utilizando el sistema de transferencia. Una vez pesada la bolsa y calculado el volumen de SCU (peso de la

bolsa llena menos peso de la bolsa vacía), se extrajeron las muestras necesarias para analizar el contenido celular y el grupo ABO/Rh de la unidad.

La SCU fue entonces criopreservada o sometida antes a alguno de los procedimientos de separación celular que posteriormente se describen. Además de tomar muestras para determinar la eficiencia de la separación, se remitió una muestra (4×10^7 células) para tipaje HLA, y se procesaron 10^7 células para la obtención de DNA que, junto con una alícuota de plasma, se conservaron a -80°C en criotubos debidamente identificados (muestra testigo-2: DNA de SCU; muestra testigo-3; Plasma de SCU). Por último, el control de esterilidad se realizó directamente en la unidad de SCU no fraccionada, o en la fracción restante de hematíes después de la separación celular. Para ello, se obtuvieron 4 ml para cultivos bacterianos (2 ml en cada uno de los frascos de cultivo para gérmenes aerobios y anaerobios, repectivamente).

2.3.3.1.- Separación celular con gradientes de densidad.

Para la separación de células mononucleadas (CMN) en gradientes de densidad, la SCU fue diluida con uno o dos volúmenes de cloruro sódico 0.9% de manera que la concentración celular fuese igual o inferior a $4 \times 10^9/\text{l}$. Se prepararon tubos con 15 ml de Ficoll-Paque o Histopaque, y se dispensaron 20 ml de SCU diluida con cuidado de no alterar las fases. Se centrifugaron a $400 \times g$ durante 25 minutos, y se recogieron el plasma sobrenadante, la interfase de CMN y todo el gradiente inferior, dejando los glóbulos rojos en el fondo del tubo. Las células se lavaron dos veces con cloruro sódico 0.9% ($400 \times g$, 10 min), y se resuspendieron en 7 ml de plasma.

2.3.3.2.- Sedimentación de hematíes con metilcelulosa 1%.

Se mezclaron 30 ml de SCU con 3.3 ml de metilcelulosa 1% (concentración final 0.1%), dejando sedimentar los hematíes durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA). Al cabo de este tiempo, se recuperaron las células en suspensión, se lavaron dos veces y se resuspendieron en 7 ml de plasma.

Para la preparación de metilcelulosa al 1%, 10 g de metilcelulosa se esterilizaron con luz ultravioleta durante 24 horas en una placa de Petri estéril, y se disolvieron en 1 litro de medio Iscove's mediante ebullición y posterior agitación a 4°C hasta que la solución de metilcelulosa quedase completamente translúcida. Se alicuotaron fracciones de 25 ml y se conservaron a -20°C. Antes de ser utilizadas, cada alícuota fue suplementada con 800 µl de L-glutamina 200 mM y 42.5 µl de una dilución 1:100 de α -monotioglicerol en medio Iscove's preparada en el momento.

2.3.3.3.- Sedimentación de hematíes con gelatina 3.5%.

A través de un adaptador para toma de muestras, se añadió un volumen de gelatina 3.5% a la unidad de SCU (concentración final 1.75%), dejando sedimentar los hematíes durante 90 minutos a 4°C. Las células en suspensión se recuperaron con un extractor de plasma por el sistema de transferencia de la bolsa, se lavaron dos veces y se resuspendieron en 7 ml de plasma.

2.3.3.4.- Sedimentación de hematíes con hidroxietil almidón 6%.

La SCU fue mezclada con HES 6% en una proporción 1:5 (concentración final 1.2%), dejando sedimentar los hematíes durante 90 minutos a TA. Las células en suspensión fueron transferidas a una bolsa estéril y centrifugadas a 600 \times g durante 10 minutos. El sedimento celular se resuspendió en 7 o 12 ml de plasma-HES residual, según el formato de criopreservación posteriormente utilizado.

2.3.3.5.- Criopreservación.

Dependiendo de la unidad a procesar (fraccionada o no fraccionada) y del formato de criopreservación, las células de SCU fueron transferidas a una bolsa de congelación (750 ml o 50 ml), o a un tubo estéril (50 ml) en caso de congelar la SCU en criotubos. Los volúmenes transferidos de SCU o de células separadas fueron, respectivamente, 80 ml, 12 ml y 7 ml. La solución crioprotectora utilizada consistió en medio 199 y DMSO 20%. Para las muestras testigo

de SCU criopreservada, se preparó una solución con DMSO 10%, que fue repartida en tres alícuotas de 1.5 ml en criotubos de 1.8 ml.

Una vez enfriadas en hielo la suspensión celular y la solución crioprotectora, se añadió lentamente un volumen de esta última sobre la suspensión celular con agitación continua, alcanzando una concentración final de DMSO de 10%. El volumen final de congelación fue 160 o 24 ml cuando la SCU se criopreservó en bolsas, y de 13 ml en el caso de congelar la SCU en tres alícuotas en criotubos de 4.5 ml. Inmediatamente antes de iniciar el proceso de congelación, se dispensaron 0.3 ml de la suspensión celular en los tres criotubos preparados con medio 199 y DMSO 10% (muestras testigo-4: SCU criopreservada), y se realizó una dilución 1:10 en medio Iscove's con 20% de SBF para análisis de viabilidad celular y ensayos clonogénicos.

El proceso de congelación fue realizado en un equipo de congelación programada de Cryoson (Heidelberg, Alemania), utilizando programas específicamente diseñados en función del volumen y formato de criopreservación. Al término de la congelación, la unidad de SCU y las tres muestras testigo de SCU se almacenaron en nitrógeno líquido (-196°C). Los programas de congelación fueron los siguientes (duración en minutos; temperatura en grados Celsius):

	<u>Bolsa (160 ml)</u>		<u>Bolsa (24 ml)</u>		<u>Criotubo (4.5 ml)</u>	
Segmento	Duración	Tª final	Duración	Tª final	Duración	Tª final
1	0.0	+ 4.0	0.0	+ 4.0	0.0	+ 4.0
2	20.0	+ 4.0	20.0	+ 4.0	20.0	+ 4.0
3	0.0	+ 0.7	0.0	+ 0.7	0.0	+ 0.7
4	10.8	- 10.0	10.8	- 10.0	10.8	- 10.0
5	0.7	- 60.5	0.5	- 40.0	0.6	- 55.0
6	1.6	- 20.0	1.2	- 18.0	1.5	- 19.0
7	7.0	- 20.0	5.3	- 18.0	6.3	- 19.0
8	20.0	- 40.0	22.0	- 40.0	21.0	- 40.0
9	10.0	- 60.0	10.0	- 60.0	10.0	- 60.0
10	5.0	- 120.0	5.0	- 120.0	5.0	- 120.0

2.3.3.6.- Descongelación.

La SCU fue sumergida en un baño a 37°C, ayudando a deshacer el contenido de la unidad congelada mediante presión y/o agitación suave. Las células descongeladas fueron procesadas de dos maneras distintas. Siguiendo el método convencional, la unidad de SCU no se sometió a ninguna manipulación adicional tras la descongelación, preparándose una dilución 1:10 de SCU descongelada en Iscove's/SBF 20% para control de viabilidad y ensayos clonogénicos. En el método de dilución 1:2 con dextrano/albúmina, se añadió lentamente un volumen de dextrano 10% y albúmina humana 5%, se centrifugó (400 ×g, 10 min) para retirar el sobrenadante, y se resuspendió el sedimento celular en un volumen igual de dextrano y albúmina. La viabilidad y los ensayos clonogénicos fueron realizados en una alícuota de las células lavadas y resuspendidas.

2.4.- Recuento y viabilidad celular.

La concentración de células nucleadas se determinó mediante un contador automático (H3, Technicon), cuyo correcto funcionamiento fue comprobado diariamente con controles analíticos comerciales. El número de células viables se determinó por exclusión de azul tripán en una cámara hemocitométrica, después de haber incubado las células con un volumen de azul tripán 0.5% durante 5 minutos a TA.

2.5.- Análisis por citometría de flujo.

2.5.1.- Análisis de antígenos de superficie.

El análisis fenotípico se realizó en células de SCU separadas con HES, y en muestras no fraccionadas de MO, SPM y SPA. La expresión antigénica fue analizada sistemáticamente mediante combinaciones triples de AcMo directamente conjugados con fluorocromos, y dirigidos frente a marcadores de células hematopoyéticas primitivas y comprometidas, linfocitos T, linfocitos B, células NK y moléculas de adhesión. Las células se incubaron durante 15 minutos a TA y en oscuridad con 10 µl de cada AcMo. Posteriormente, se añadieron 2 ml de

solución de lisis FACS, se incubaron 10 minutos en las mismas condiciones, se lavaron ($600 \times g$, 5 min) y se resuspendieron en 0.5 ml de PBS para análisis por citometría de flujo. En todos los casos, se utilizó un control negativo isotípico (Becton Dickinson) para determinar la fluorescencia inespecífica.

La adquisición de datos se realizó mediante el programa Cellquest (Becton Dickinson) en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson) equipado con un láser argón ajustado a 488 nm y 15 mW. En cada ensayo, se adquirieron como mínimo 10.000 eventos. Para el análisis de los datos, se empleó el programa PAINT-A-GATE PRO (Becton Dickinson). Las células progenitoras hematopoyéticas se identificaron inicialmente por sus características de baja SSC (*side-scatter*) y expresión intermedia de CD45, mientras que los linfocitos fueron reconocidos por su baja SSC y reactividad intensa para CD45. En ambos casos, los resultados fueron referidos a estas dos poblaciones: ventana de progenitores (baja SSC/CD45⁺) y ventana de linfocitos (baja SSC/CD45⁺⁺⁺).

2.5.2.- Análisis de citocinas intracelulares.

Para este análisis, se analizaron muestras no fraccionadas de SCU y SPA diluidas en medio RPMI. Las células se estimularon con PMA (25 ng/ml) e ionomicina (1 $\mu g/ml$) durante 48 horas, en presencia de brefeldina (10 $\mu g/ml$), en un incubador a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, se lavaron dos veces en PBS con 1% de BSA, y se marcaron con AcMo anti-CD3, anti-CD4 o anti-CD8. Para ello, se incubaron durante 15 minutos a TA y en oscuridad con 20 μl de cada uno de los AcMo citados. Después, se añadieron 2 ml de solución de lisis FACS, se incubaron 10 minutos en las mismas condiciones, y se centrifugaron a $600 \times g$ durante 5 minutos. Tras añadir al sedimento celular solución permeabilizante FACS para fijar y permeabilizar las células, éstas se incubaron con anti-CD69 (un marcador de activación precoz) y con AcMo frente a IL-2, IL-4 e IFN- γ .

El análisis de los datos fue similar al utilizado en el estudio de antígenos de superficie, exceptuando la ventana de adquisición, definida en este caso por SSC y expresión de CD3. En

todos los experimentos, se realizó un control de activación consistente en una estimulación celular en condiciones idénticas, pero sin brefeldina. Las células se tiñeron con anti-CD69 y anti-CD3, considerándose una activación celular adecuada cuando más del 90% de las células T expresaban CD69.

2.6.- Cultivos de progenitores hematopoyéticos.

Los ensayos clonogénicos se realizaron empleando un medio de cultivo (MethoCult H4431, Stem Cell Technologies) que promueve la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas de estirpe granulo/monocítica y eritrocítica. Las células fueron sembradas a una concentración de 5×10^4 /ml, agitando la suspensión celular en un vórtex. Después de sedimentar el medio durante 15 minutos a TA para que las burbujas de aire atrapadas ascendieran a la superficie, se dispensaron 0.3 ml por duplicado en una placa de 24 pocillos, rellenando con agua estéril el resto de pocillos no utilizados.

Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 14 días, al cabo de los cuales se contaron las colonias en un microscopio de luz invertida. Se consideraron CFU-GM las agrupaciones con ≥ 50 células granulo/monocíticas, y BFU-E las agrupaciones con ≥ 50 células eritrocíticas (hemoglobinizadas) y/o ≥ 3 agrupaciones de 8 o más células eritrocíticas. Las colonias compuestas por células pertenecientes a dos o más linajes fueron identificadas como CFU-GEMM. La eficiencia clonogénica referida a 5×10^4 células se calculó realizando un promedio del recuento de colonias en dos pocillos y multiplicando por un factor de 3.3.

2.7.- Determinación de antígenos HLA.

Los protocolos para estos ensayos fueron los utilizados rutinariamente en el Servicio de Inmunología del Hospital 12 de Octubre. A continuación se describen someramente los métodos empleados en cada una de las determinaciones.

2.7.1.- Antígenos HLA de clase I

Las técnicas se describen en orden de menor a mayor nivel de resolución en la determinación de alelos HLA:

i) Microlinfocitotoxicidad estándar, realizada sobre linfocitos totales en cinco placas diferentes: 2 placas con 58 anticuerpos policlonales cada una, incluyendo siempre en cada placa un control negativo y uno positivo; 3 placas comerciales con 70 anticuerpos monoclonales por placa (One lambda).

ii) PCR-SSP (*sequence-specific-primer*), basada en la amplificación específica de alelos o grupos de alelos en los loci HLA-A, -B, -C definidos por su secuencia. Se utilizaron kits comerciales de las siguientes casas: Dynal, Boehringer Ingelheim y Biosynthesis.

iii) Oligotipaje con sondas específicas, basada en la amplificación de los dos alelos de cada locus (HLA-A, -B, -C) a estudiar. Los productos amplificados se fijaron en una membrana de nylon y se enfrentaron a una batería de sondas específicas, que comprendían regiones exónicas e intrónicas de los alelos y grupos de alelos para cada locus: 30 sondas para HLA-A, 50 sondas para HLA-B, y 30 sondas para HLA-C. Las sondas positivas se evidenciaron mediante revelado por color.

iv) Secuenciación después de clonaje. Se realizó mediante una amplificación conjunta de los dos alelos de cada locus. Los productos resultantes se purificaron por métodos comerciales (QIAquick gel extraction kit, QIAgen), y se insertaron en un vector plasmídico (p-Mosblue-T vector, Amershan). Los plásmidos recombinantes fueron introducidos en bacterias *E. coli* competentes, después de lo cual se sembraron en placas de agar con antibiótico, IPTG y X-gal. Se aisló el plásmido de las colonias recombinantes (resistentes al antibiótico y carentes de actividad β -galactosidasa) y se procedió a su secuenciación.

v) Secuenciación directa, que proporciona una resolución máxima en la determinación de alelos HLA. La amplificación específica de los dos alelos de cada loci se realizó por separado,

debido al polimorfismo específico que se encuentra en el intrón 1, permitiendo la secuenciación en un tiempo muy corto (1 día).

2.7.2.- Antígenos HLA de clase II

La caracterización de los antígenos HLA de clase II fue realizada en todas las muestras con técnicas de genética molecular: PCR-SSP (para HLA-DR, -DQ), secuenciación directa (para HLA-DRB) y secuenciación después de clonaje (para HLA-DRB, -DQA, -DQB), tal y como se describe para los antígenos de clase I. Además, se utilizaron:

i) *Dot-blot* reverso con el sistema Amplicor (Roche) para el tipaje HLA-DR a una resolución media-baja. Tras una amplificación genética del exón 2 polimórfico, el producto resultante se enfrentó a una tira que llevaba fijados oligonucleótidos específicos de alelos o grupos de alelos. Mediante procesos de incubación, lavado y revelado por color, se determinaron los oligonucleótidos que dieron positivos para la muestra. Finalmente, el tipaje fue facilitado por un programa informático.

ii) *Dot-blot* reverso con el sistema Inolipa (Innogenetics), basado en las mismas premisas que el anterior, que permitió determinar tanto antígenos HLA-DRB como DQB y DP con un nivel alto de resolución.

2.8.- Análisis estadístico.

2.8.1.- Comparación de muestras independientes (prueba U de Mann-Whitney).

Las diferencias en el contenido de células progenitoras hematopoyéticas en SCU, MO y SPM, en las subpoblaciones linfocitarias de SCU y SPA, la eficacia de los distintos métodos de separación celular y de los formatos empleados para la criopreservación de SCU se analizaron con el procedimiento de comparación de dos muestras independientes respecto de la variable de estudio. Se aplicó la prueba de Mann-Whitney para comprobar si las observaciones en ambos grupos de datos eran equivalentes.

2.8.2.- Comparación de variables categóricas (prueba de Chi-cuadrado).

La efectividad de los procedimientos de asepsia durante la recogida de SCU fue analizada con la prueba de Chi-cuadrado. Las variables se tabularon en categorías y se compararon las frecuencias observadas y esperadas en cada una de ellas, con objeto de comprobar si contenían la misma proporción o, por el contrario, una proporción específica de valores.

2.8.3.- Comparación de medias (prueba *t*).

Los datos de viabilidad celular y de progenitores hematopoyéticos en las distintas fases del procesamiento, así como en el análisis de los métodos empleados para la descongelación de SCU, fueron obtenidos en las mismas muestras de SCU de forma longitudinal y paralela, respectivamente. La comparación de resultados en estos estudios se llevó a cabo con la prueba *t* de muestras pareadas. Para el análisis de la repercusión del intervalo entre la obtención y el procesamiento de SCU, los valores de viabilidad y células progenitoras según el tiempo transcurrido desde la recogida fueron comparados mediante la prueba *t* para muestras no pareadas.

2.8.4.- Análisis de correlación bivalente.

La determinación de una asociación lineal entre volumen y celularidad, y entre viabilidad celular, número de progenitores hematopoyéticos y tiempo entre la obtención y el procesamiento de SCU se realizó con el procedimiento de correlación bivalente y el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson.

2.8.5.- Regresión lineal.

El impacto de factores obstétricos y maternos sobre la celularidad de SCU se analizó mediante el procedimiento de regresión lineal. Las variables clínicas perinatales y los parámetros biológicos estudiados se obtuvieron en el momento de la donación y durante el

procesamiento de la SCU, respectivamente. Los datos fueron analizados mediante una regresión paso a paso en sentido anterógrado (*forward*) y retrógrado (*backward*), habiéndose fijando el nivel de significación al 5%. Las ecuaciones de regresión para cada variable dependiente se calcularon con el procedimiento REGRESSION del programa estadístico SPSS v.6.1 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). La regresión lineal estimó los coeficientes de la ecuación, referidos a una o más variables independientes, que mejor predijo el valor de la variable dependiente.

RESULTADOS

1.- CARACTERÍSTICAS HEMATOPOYÉTICAS E INMUNOLÓGICAS DE LA SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL. ANÁLISIS DE LA MUESTRA DE ESTUDIO.

Uno de los objetivos primordiales de un Banco de Sangre de Cordón Umbilical consiste en ofrecer las máximas garantías de un injerto hematopoyético eficaz en los pacientes que reciben un trasplante de SCU. Como se ha apuntado anteriormente, el éxito del trasplante de SCU depende de múltiples factores, unos relacionados con el receptor (por ejemplo, naturaleza de la enfermedad de base, estado de la enfermedad –remisión o recidiva–, intensidad y duración de los tratamientos previos de quimio/radioterapia), y otros relacionados con las características biológicas del injerto (por ejemplo, potencial de implante hematopoyético, capacidad aloreactiva, disparidad HLA). Al plantearnos el desarrollo de un Banco de SCU en el Hospital 12 de Octubre, y con la finalidad de establecer criterios mínimos para el procesamiento y depósito de unidades de SCU óptimas para trasplante, consideramos que en primer lugar debían ser analizadas las características hematopoyéticas e inmunológicas de la sangre de cordón umbilical. Por tanto, decidimos estudiar una serie de parámetros biológicos que nos permitieran definir genéricamente estas características de la SCU, y evaluar individualmente cada una de las unidades incluidas en el Banco.

El estudio que se describe en este primer apartado ha sido realizado sobre una muestra no seleccionada de 300 unidades de SCU, obtenidas consecutivamente en un periodo de 30 meses. Todas las unidades recogidas en este periodo han sido analizadas y criopreservadas sin excepción alguna, esto es, sin tener en cuenta el volumen, celularidad total, contenido de progenitores hematopoyéticos, distribución de subpoblaciones linfocitarias o fenotipo HLA. Ya que se trata del análisis de un número suficientemente elevado de unidades de SCU, y previsiblemente de una muestra sin desviaciones al no haberse introducido ninguna preselección antes del procesamiento de las unidades, los resultados obtenidos en este análisis constituyen una descripción típica de la sangre de cordón umbilical como producto de trasplante hematopoyético.

Ya hemos reseñado que el potencial de reconstitución medular y la capacidad aloreactiva son los dos aspectos del injerto más relevantes que condicionan el éxito de un trasplante de

células hematopoyéticas, y que el trasplante de SCU presenta unas características distintivas respecto a los trasplantes de médula ósea (MO) y sangre periférica movilizada (SPM) de adultos, de las cuales merecen ser destacadas la menor incidencia de enfermedad injerto contra huésped (EICH) y la capacidad de repoblación medular con un número menor de células infundidas. Con el fin de revelar posibles diferencias biológicas que ayuden a explicar estas diferencias clínicas tan notables entre ambos tipos de trasplantes, hemos llevado a cabo también un estudio comparativo de los parámetros hematopoyéticos e inmunológicos de SCU respecto a MO, SPM y/o SPA.

1.1.- Células nucleadas totales en SCU.

La experiencia acumulada hasta la actualidad demuestra que uno de los principales factores que influyen en la recuperación de las cifras de neutrófilos y plaquetas en sangre periférica tras un trasplante de SCU es el número de células nucleadas totales infundidas. Así, la probabilidad de implante es del 89% y 74% en pacientes trasplantados con una dosis celular superior e inferior, respectivamente, a 3.7×10^7 células nucleadas por kilo de peso (Gluckman y cols., 1997; Locatelli y cols., 1999). Por esta razón, hemos querido realizar en primer lugar un análisis de la celularidad total contenida en las unidades de SCU, subrayando la variabilidad en cuanto a riqueza celular y, de acuerdo con ella, la previsión de utilización para trasplante de las unidades procesadas en pacientes pediátricos y adultos.

Como se verá más adelante (apartado 3.1.), hemos introducido un procedimiento de obtención de SCU que consiste en la suma de dos fracciones recogidas mediante punción de la vena umbilical y perfusión arteriovenosa de la placenta, respectivamente. Los resultados conseguidos con esta metodología quedan pormenorizados en dicho apartado 3.1, así como también la importancia de su utilización. Aquí se muestran la celularidad de las unidades obtenidas con dicha técnica de recolección, y el análisis realizado sobre el potencial de trasplante de la muestra de SCU estudiada.

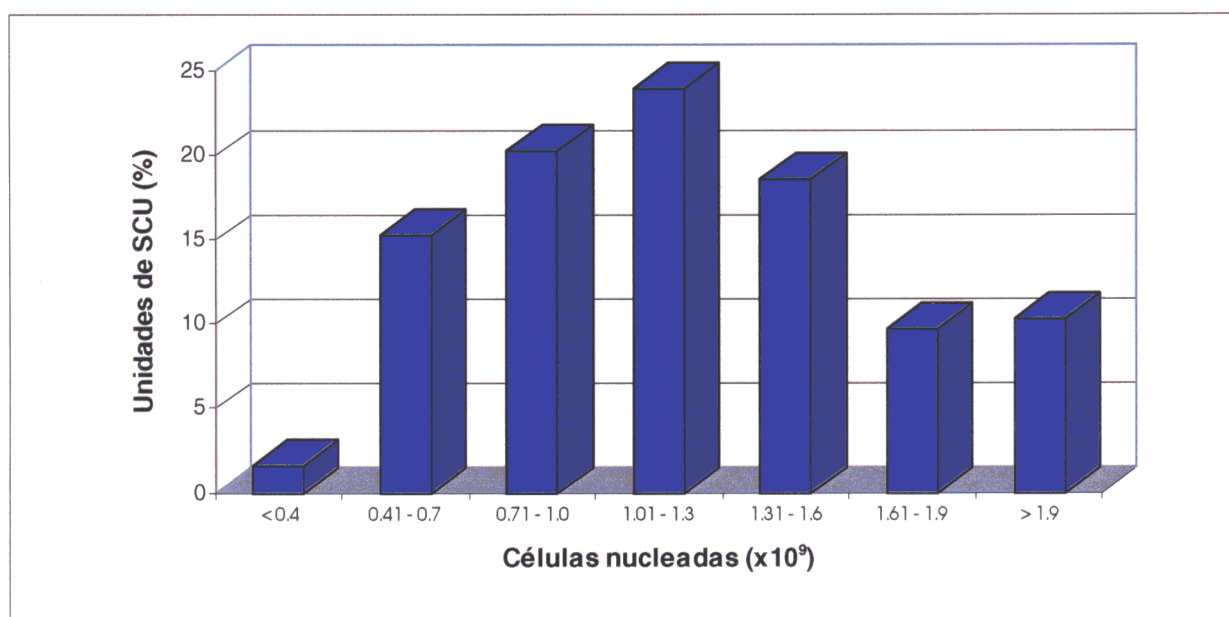


FIGURA 1. Frecuencia de unidades de SCU de acuerdo con el contenido total de células nucleadas.

El número de células nucleadas en las 300 unidades de SCU de la muestra de estudio fue $1.22 \pm 0.51 \times 10^9$, con un rango de 0.34 a 3.43×10^9 . La distribución de las unidades de acuerdo con la celularidad total se muestra en la figura 1. Aproximadamente, dos tercios de las unidades contenían entre 0.7 y 1.6×10^9 células nucleadas. Un 17% tenían un número de células inferior a 0.7×10^9 , y un 20% tenían más de 1.6×10^9 .

Teniendo en cuenta que la dosis celular media en las series publicadas de trasplante de SCU en pacientes pediátricos y adultos es, respectivamente, 3.7 y $2.0 \times 10^7/\text{kg}$, y que el peso corporal medio en estos receptores era de 20 y 55 kg (Gluckman y cols., 1997; Laporte y cols., 1998), alrededor de un 80% y un 60% de las unidades de la muestra de estudio (es decir, unidades con más de 0.7 y 1×10^9 células nucleadas) hubieran proporcionado este número de células en receptores de trasplante de los dos grupos de edad respectivos. Es más, de las 300 unidades de SCU analizadas, en 119 el contenido total de células nucleadas fue igual o superior a 1.3×10^9 , lo cual significa que el 40% de las unidades del Banco proporcionarían una dosis superior a 2×10^7 células nucleadas por kilo de peso en receptores adultos de hasta 65 kg.

1.2.- Células primitivas y progenitoras hematopoyéticas de SCU. Comparación con médula ósea y sangre periférica movilizada del adulto.

Si bien la determinación de la celularidad total permite establecer un criterio inicial para definir la riqueza de una unidad de SCU, la capacidad de repoblación hematopoyética reside en última instancia en la presencia de células primitivas pluripotenciales viables que aseguren una reconstitución sostenida de todos los linajes celulares. El ensayo que mejor define esta capacidad de autorrenovación consiste en la reconstitución hematopoyética *in vivo* en el modelo murino SCID/NOD. Dentro de los ensayos *in vitro*, aquel en el que se determinan las células progenitoras más inmaduras es la cuantificación de células iniciadoras de cultivos a largo plazo (LTC-IC). Sin embargo, la complejidad, laboriosidad y el coste elevado de estos experimentos impiden su aplicación rutinaria en el análisis de las unidades procesadas en un Banco de SCU.

Alternativamente, la detección y cuantificación mediante ensayos clonogénicos (técnicamente más simples) de células progenitoras más diferenciadas, comprometidas en la diferenciación únicamente de uno o hasta tres linajes celulares, permite inferir la presencia de un número proporcional de células primitivas. Asimismo, la caracterización fenotípica por citometría de flujo, aunque no informa de la funcionalidad de las células hematopoyéticas, constituye una herramienta rápida de análisis tanto de células primitivas como de células progenitoras en base a la expresión en la superficie celular de marcadores específicos que sirven para su identificación.

Hemos combinado estas dos últimas metodologías para estudiar las distintas poblaciones celulares hematopoyéticas en SCU. Además, hemos comparado el contenido en células primitivas y progenitoras de sangre de cordón umbilical con el de médula ósea y/o sangre periférica movilizada del adulto, con objeto de cuantificar posibles diferencias relacionadas con el potencial de implante hematopoyético de la SCU respecto al de las otras dos fuentes de células progenitoras habitualmente empleadas en trasplante.

1.2.1.- Análisis fenotípico de células CD34⁺.

El antígeno CD34 se expresa muy tempranamente en las células hematopoyéticas primitivas. Su expresión se mantiene en los primeros estadios de diferenciación de las células más inmaduras, cuando éstas dan lugar a células progenitoras comprometidas a los diferentes linajes celulares hematopoyéticos. Coincidiendo con la aparición de la progenie celular más diferenciada a partir de las células progenitoras, cesa la expresión de este antígeno, de manera que todas las células postprogenitoras maduras son CD34 negativas.

La expresión concomitante de otros antígenos de superficie ayuda a la caracterización y distinción entre las células más primitivas y las células progenitoras, así como entre los progenitores pertenecientes a distintos linajes hematopoyéticos. De esta forma, un análisis citofluorométrico bi- o trivariante basado en la detección del antígeno CD34 junto a determinados antígenos específicos de linaje, permite la identificación y enumeración de los distintos progenitores hematopoyéticos según su estadio y compromiso de diferenciación.

En la tabla 1 se indica el porcentaje y el número absoluto de células CD34⁺ totales en la muestra de SCU estudiada. De las 183 unidades de SCU analizadas, 133 (73%) contenían más de

TABLA 1. Determinación por citometría de flujo de células CD34⁺ de SCU

	Células CD34 ⁺	
	Frecuencia (%)	Total (×10 ⁶)
media ± ds	0.39 ± 0.26	4.66 ± 4.28
mediana	0.31	3.43
extremos	0.06 - 1.41	0.53 - 26.46

Los resultados muestran el análisis realizado sobre 183 unidades de SCU.

Abreviaturas: SCU, sangre de cordón umbilical; ds, desviación estándar.

2×10^6 células $CD34^+$, lo que equivaldría a infundir una dosis al menos superior a 0.3×10^5 células $CD34^+$ por kg de peso en receptores de hasta 65 kg. Esta cifra es aproximadamente 100 veces inferior a la cantidad de células $CD34^+$ que se infunden con los trasplantes de MO y SPM.

1.2.1.1.- Células primitivas.

La población $CD34^+$ comprende las células más primitivas y las células progenitoras más diferenciadas, pudiendo distinguirse ambas subpoblaciones en función de la expresión adicional de antígenos como CD38 y HLA de clase II (HLA-DR), cuya expresión se establece con el grado de diferenciación. Una vez definidos los porcentajes globales de células $CD34^+$, determinamos las poblaciones de células más primitivas $CD34^+/CD38^-$ y de células más diferenciadas $CD34^+/CD38^+/HLA-DR^+$, así como las correspondientes a células progenitoras $CD34^+/CD38^+$ comprometidas a los linajes granulocito-macrofágico ($CD33^+/CD13^+$), megacariocítico ($CD61^+/CD41^+$) y linfoide B ($CD10^+/CD19^+$).

El análisis comparativo con MO y SPM de adulto (Tabla 2) mostró porcentajes similares al de SCU de células primitivas $CD34^+/CD38^-$ y células progenitoras $CD34^+/CD38^+$ (3.3 vs 1.13 vs 2.48%, y 94.9 vs 99.38 vs 97.86%, respectivamente). Sin embargo, aparecieron diferencias a nivel de los progenitores más inmaduros dentro de la subpoblación $CD34^+/CD38^-$ definidos como células $CD34^+/CD38^-/HLA-DR^-$, ya que en SCU más del 60% de las células $CD34^+/CD38^-$ eran $HLA-DR^-$, mientras que en MO solo una tercera parte de las mismas eran $HLA-DR^-$ y en SPM no se detectó este subtipo de progenitores inmaduros (Tabla 2).

Podemos concluir, por tanto, que la SCU tiene en términos absolutos (cuando se tiene en cuenta el número total de células trasplantadas) un contenido de células $CD34^+$ unas 100 veces inferior al de MO o SPM, si bien el porcentaje de células más primitivas $CD34^+/CD38^-/HLA-DR^-$ es significativamente superior en SCU.

TABLA 2. Células primitivas CD34⁺/CD38⁻ y células progenitoras CD34⁺/CD38⁺ en SCU. Comparación con MO y SPM del adulto

Fenotipo	SCU	MO	SPM	p
CD38 ⁻ /HLA-DR ⁻	1.56 ± 0.79	1.2 ± 2.0	0	<0.01
CD38 ⁻ /HLA-DR ⁺	0.92 ± 0.76	2.1 ± 3.3	1.13 ± 1.73	NS
CD38 ⁺ /HLA-DR ⁻	6.76 ± 3.49	16.9 ± 18.5	5.95 ± 2.46	NS
CD38 ⁺ /HLA-DR ⁺	91.1 ± 4.6	78.0 ± 19.8	93.43 ± 3.12	NS

Subpoblaciones de células CD34⁺ determinadas por citometría de flujo en sangre de cordón umbilical (n=10), médula ósea (n=4) y sangre periférica movilizada (n=4), analizando la coexpresión de CD38 y HLA-DR. Los resultados muestran el porcentaje medio ± ds de las diferentes poblaciones sobre el total de células CD34⁺.

Abreviaturas: SCU, sangre de cordón umbilical; MO, médula ósea de adulto; SPM, células progenitoras movilizadas de sangre periférica de adulto; p, prueba de significación estadística (U de Mann-Whitney); NS, diferencia no significativa.

Además del estudio del compartimento de células hematopoyéticas primitivas, se ha analizado también la composición de las poblaciones de células progenitoras más diferenciadas, comprometidas a los distintos linajes de diferenciación. Consideramos importante analizar este compartimento, ya que la determinación del número de progenitores hematopoyéticos comprometidos permitiría comprobar si la velocidad de recuperación postrasplante en sangre periférica de células maduras pertenecientes a las distintas líneas de diferenciación (granulocitos, monocitos, plaquetas, linfocitos) guarda relación con la cantidad infundida de sus correspondientes progenitores. En consecuencia, hemos analizado la proporción de progenitores de línea granulocito-macrofágica, megacariocítica y linfoide B, comparando los resultados obtenidos en SCU con los de MO y SPM.

1.2.1.2.- Células progenitoras granulocito-macrofágicas.

Entre un 70 a 90%, aproximadamente, de las células CD34⁺/HLA-DR⁺ expresaban antígenos de diferenciación granulocito-macrofágica CD33, CD13 y CD117. Por el contrario, la

TABLA 3. Células progenitoras CD34⁺ con diferenciación granulocito-macrofágica en SCU. Comparación con MO del adulto

Fenotipo	SCU	MO	p
CD33 ⁺ /HLA-DR ⁺	86.1 ± 5.56	69.0 ± 19.9	NS
CD13 ⁺ /HLA-DR ⁺	89.5 ± 2.91	74.0 ± 31.0	NS
CD117 ⁺ /HLA-DR ⁺	76.7 ± 7.8	51.8 ± 23.9	NS
CD15 ⁺ /HLA-DR ⁺	11.8 ± 4.37	18.3 ± 8.1	NS

Subpoblaciones de células CD34⁺ determinadas por citometría de flujo en sangre de cordón umbilical n=10) y médula ósea (n=4), analizando la coexpresión de marcadores de diferenciación mieloide (CD33⁺, CD13⁺, CD117⁺ y CD15⁺). Los resultados muestran el porcentaje medio ± ds de las diferentes poblaciones sobre el total de células CD34⁺.

Abreviaturas: SCU, sangre de cordón umbilical; MO, médula ósea de adulto; p, prueba de significación estadística (U de Mann-Whitney); NS, diferencia no significativa.

expresión de CD15, un marcador de diferenciación granulocítica terminal, se detectó en un porcentaje inferior, en torno al 10-20%. En ninguna de estas subpoblaciones granulocito-macrofágicas se han evidenciado diferencias significativas entre SCU y MO (Tabla 3).

1.2.1.3.- Células progenitoras megacariocíticas.

Tampoco se observaron diferencias significativas en la frecuencia de células CD34⁺ con diferenciación megacariocítica (CD61⁺ y/o CD41⁺) en SCU, MO y SPM, con porcentajes que oscilaron entre el 16 y 28% de células CD34⁺/CD61⁺, y entre el 12 y 22% de células CD34⁺/CD41⁺ (Tabla 4). El análisis de la expresión HLA-DR en los progenitores megacariocíticos para discriminar aquellos que son más inmaduros (HLA-DR⁻) de los más diferenciados (HLA-DR⁺), tampoco reveló diferencias significativas en la distribución de ambos compartimentos entre las tres fuentes de células hematopoyéticas (Tabla 4).

TABLA 4. Células progenitoras CD34⁺ con diferenciación megacariocítica en SCU. Comparación con MO y SPM del adulto

Fenotipo	SCU	MO	SPM	p
CD61 ⁺ /HLA-DR ⁺	18.8 ± 7.83	15.3 ± 12.1	24.8 ± 3.67	NS
CD61 ⁺ /HLA-DR ⁻	2.02 ± 1.03	0.9 ± 0.7	3.4 ± 2.81	NS
CD41 ⁺ /HLA-DR ⁺	10.45 ± 4.9		20.6 ± 5.98	NS
CD41 ⁺ /HLA-DR ⁻	2.03 ± 2.38		2.05 ± 1.35	NS

Subpoblaciones de células CD34⁺ determinadas por citometría de flujo en sangre de cordón umbilical (n=10), médula ósea (n=4) y sangre periférica movilizada (n=4), analizando la coexpresión de marcadores de diferenciación megacariocítica (CD61⁺ y CD41⁺). Los resultados muestran el porcentaje medio ± ds de las diferentes poblaciones sobre el total de células CD34⁺.

Abreviaturas: SCU, sangre de cordón umbilical; MO, médula ósea de adulto; SPM, células progenitoras movilizadas de sangre periférica de adulto; p, prueba de significación estadística (U de Mann-Whitney); NS, diferencia no significativa.

1.2.1.4.- Células progenitoras linfoides B.

En cuanto a los progenitores CD34⁺ pertenecientes al linaje linfoide B (CD10⁺ y/o CD19⁺), los resultados obtenidos (Tabla 5) confirman la ausencia de los mismos en SCU.

TABLA 5.- Células progenitoras CD34⁺ con diferenciación linfoide B en SCU. Comparación con MO del adulto

Fenotipo	SCU	MO	p
CD10 ⁺	0	18.6 ± 11.8	<0.01
CD19 ⁺	0	12.3 ± 13.2	<0.01

Subpoblaciones de células CD34⁺ determinadas por citometría de flujo en sangre de cordón umbilical (n=10) y médula ósea (n=4), analizando la coexpresión de marcadores de diferenciación linfoide B (CD10⁺, CD19⁺). Los resultados muestran el porcentaje medio ± ds de las diferentes poblaciones sobre el total de células CD34⁺.

Abreviaturas: SCU, sangre de cordón umbilical; MO, médula ósea de adulto; p, prueba de significación estadística (U de Mann-Whitney).

Los resultados descritos muestran que la presencia de células progenitoras de diferentes linajes, a excepción de los progenitores linfoides B, parece ser similar en SCU, MO y SPM. El análisis citométrico de progenitores pertenecientes a distintos linajes, si bien indicativo de la presencia de los mismos en SCU, debe necesariamente completarse con un estudio funcional que demuestre la capacidad proliferativa de los mismos. Este estudio se ha realizado mediante ensayos clonogénicos, cuyos resultados se describen a continuación.

1.2.2.- Células formadoras de colonias.

La determinación de progenitores hematopoyéticos mediante ensayos clonogénicos está sujeta a una gran variabilidad dependiente de las condiciones de cultivo, la actividad de los factores de crecimiento empleados y la subjetividad en el recuento de las colonias. Por ello, los datos numéricos que se obtienen con estos ensayos no pasan de ofrecer una información semicuantitativa del contenido de células progenitoras presentes en la muestra. Sin embargo, ofrecen la posibilidad de comprobar la funcionalidad de las células clonogénicas en cuanto a su capacidad de proliferación y diferenciación *in vitro* y, por tanto, de la viabilidad de las mismas. La combinación de función hematopoyética y semicuantificación de células progenitoras que proporcionan los ensayos clonogénicos determina su importancia en la evaluación del potencial hematopoyético de cualquiera de los productos utilizados para trasplante, y es por ello por lo que deben constituir una herramienta de rutina en la caracterización de las unidades de SCU.

1.2.2.1.- CFU-GEMM, CFU-GM y BFU-E.

En la tabla 6 se exponen los valores obtenidos en la muestra de estudio referentes a la eficiencia clonogénica y al número absoluto de células formadoras de colonias granulocito-macrofágicas (CFU-GM), eritroides (BFU-E) y mixtas (granulocito-eritroblasto-macrófago-megacariocito, CFU-GEMM) en SCU. Como puede observarse, la muestra no seguía una distribución normal en ninguno de los progenitores, al tiempo que la dispersión respecto al valor medio fue muy amplia. En este caso, la mediana y el rango informan mejor del contenido de células progenitoras clonogénicas de las unidades de SCU. Tanto la eficiencia clonogénica como

TABLA 6.- Determinación de progenitores hematopoyéticos clonogénicos en SCU

	CFU-GM		BFU-E		CFU-GEMM	
	EC	Total ($\times 10^5$)	EC	Total ($\times 10^5$)	EC	Total ($\times 10^5$)
media \pm ds	17.58 \pm 11.6	4.39 \pm 3.7	25.33 \pm 16	6.26 \pm 5.22	4.08 \pm 3.46	1.09 \pm 1.5
mediana	15.95	3.33	22.55	4.66	3	0.64
extremos	0 - 75	0 - 24.27	0 - 104	0 - 32.24	0 - 19	0 - 10.29

Eficiencia clonogénica y número absoluto de células progenitoras hematopoyéticas determinadas mediante ensayos clonogénicos. Los resultados muestran el análisis realizado sobre 300 unidades de SCU, excepto en CFU-GEMM donde se han analizado 75 unidades.

Abreviaturas: CFU-GM, células formadoras de colonias granulocito-macrofágicas; BFU-E, células formadoras de *bursts* eritroides; CFU-GEMM, células formadoras de colonias mixtas (granulocito-eritroblasto-macrófago-megacariocito); EC, eficiencia clonogénica (numero de colonias en 5×10^4 células sembradas en el cultivo).

el número total de BFU-E fue 1.4 veces superior a los valores correspondientes de CFU-GM. Con respecto al contenido de CFU-GEMM, la proporción de CFU-GM y BFU-E fue del orden de 5 a 7 veces mayor.

TABLA 7.- Células progenitoras megacariocíticas (CFU-Mk) en SCU. Comparación con SPM del adulto

	SCU	SPM	p
media	11.20	5.87	NS
ds	10.83	4.76	
extremos	4 - 30	1.4 - 15	

Eficiencia clonogénica (numero de colonias en 10^5 células sembradas en el cultivo) de progenitores megacariocíticos determinados mediante ensayos clonogénicos en sangre de cordón umbilical (n=5) y sangre periférica movilizada (n=8).

Abreviaturas: CFU-Mk, células formadoras de colonias megacariocíticas; SCU, sangre de cordón umbilical; SPM, células progenitoras movilizadas de sangre periférica de adulto; p, prueba de significación estadística (U de Mann-Whitney). NS: diferencia no significativa; ds, desviación estándar.

1.2.2.2.- CFU-Mk.

La determinación de células formadoras de colonias megacariocíticas (CFU-Mk) se realizó solo en 5 muestras de SCU (Tabla 7), siendo la eficiencia clonogénica de estos progenitores 3 y 5 veces menor que las de CFU-GM y BFU-E respectivamente.

En las tablas 7 y 8 se comparan la eficiencia clonogénica de CFU-Mk y CFU-GM de SCU, MO y SPM. La frecuencia de CFU-GM en SCU fue casi tres veces superior a la de MO y similar a la que se observó en SPM. Igualmente, la frecuencia de CFU-Mk en SCU fue prácticamente el doble que en SPM.

En conjunto, de todos estos resultados puede concluirse que la SCU posee al menos una proporción similar, si no mayor, respecto a MO y SPM de células primitivas más inmaduras ($CD34^+/CD38^-/HLA-DR^-$), y de células progenitoras granulocito-macrofágicas, eritroides y megacariocíticas, existiendo simultáneamente una ausencia de progenitores comprometidos en la diferenciación linfóide B.

TABLA 8. Células progenitoras granulocito-macrofágicas (CFU-GM) en SCU. Comparación con MO y SPM del adulto

	SCU	MO	SPM	p
media	46.40	16.80	44.20	<0.01
ds	22.22	12.50	28.50	
extremos	10 - 86	4 - 38	11 - 94	

Eficiencia clonogénica (numero de colonias en 10^5 células sembradas en el cultivo) de progenitores granulocito-macrofágicos determinados mediante ensayos clonogénicos en sangre de cordón umbilical (n=10), médula ósea (n=10) y sangre periférica movilizada (n=10).

Abreviaturas: CFU-GM, células formadoras de colonias granulocito-macrofágicas; SCU, sangre de cordón umbilical; MO, médula ósea de adulto; SPM, células progenitoras movilizadas de sangre periférica de adulto; p: prueba de significación estadística (U de Mann-Whitney).

1.3.- Células linfocitarias de SCU. Comparación con sangre periférica de adulto.

Uno de los aspectos de la SCU que más entusiasmo ha generado es la menor incidencia y severidad de enfermedad injerto contra huésped (EICH) cuando se utiliza esta fuente de células hematopoyéticas, siendo posible la realización de trasplantes de SCU con un mayor grado de incompatibilidad HLA que en los trasplantes de MO o SPM de donantes adultos.

Como se ha mencionado anteriormente, la EICH es una complicación en la que linfocitos T reactivos frente a antígenos del sistema HLA, y probablemente también células *natural killer* (NK), juegan un papel relevante. Ambos tipos de células producen citocinas que son mediadores importantes de este proceso. La secreción de una variedad de citocinas proinflamatorias tales como interleucina-2 (IL-2), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) e interferón- γ (IFN- γ) por linfocitos T aloreactivos inducen daño tisular bien directamente, o a través de la activación de otras células efectoras como células T citotóxicas, células B productoras de anticuerpos y células NK.

Con el fin de investigar si existen diferencias en el sistema inmune neonatal que pudieran justificar la menor ocurrencia y gravedad de EICH en los trasplantes de SCU, hemos comparado el inmunofenotipo y el perfil de producción de citocinas de linfocitos de sangre de cordón umbilical frente a los de sangre periférica del adulto.

1.3.1.- Análisis fenotípico de poblaciones linfocitarias.

El análisis de las distintas poblaciones linfocitarias se llevó a cabo por tipaje citofluorimétrico, con anticuerpos específicos de células T (CD3⁺), células B (CD19⁺) y células NK (CD3⁻/CD7⁺). Las principales subpoblaciones linfocitarias (linfocitos T CD3⁺, linfocitos B CD19⁺ y células NK CD3⁻/CD7⁺) se mostraron porcentualmente similares en sangre de cordón umbilical y sangre periférica del adulto (Tablas 9, 12 y 13).

TABLA 9. Análisis fenotípico de linfocitos T de SCU. Comparación con sangre periférica del adulto

Fenotipo	SCU	SPA	p
CD3 ⁺	72.0 ± 9.7	73.5 ± 3.8	NS
CD3 ⁺ /CD4 ⁺	53.8 ± 7.8	45.3 ± 5.2	0.04
CD3 ⁺ /CD8 ⁺	16.0 ± 4.8	29.6 ± 4.7	<0.001
ratio CD4/CD8	3.7 ± 0.9	1.6 ± 0.4	<0.001
CD3 ⁺ /TCRαβ ⁺	69.2 ± 10.1	74.0 ± 3.1	NS
CD3 ⁺ /TCRγδ ⁺	1.8 ± 1.1	2.2 ± 1.9	NS
CD3 ⁺ /CD25 ⁺	5.3 ± 0.6	12.2 ± 4.0	<0.001
CD3 ⁺ /CD38 ⁺	70.7 ± 10.3	39.4 ± 5.1	<0.001
CD3 ⁺ /HLA-DR ⁺	0.8 ± 0.5	6.6 ± 1.6	<0.001
CD3 ⁺ /CD56 ⁺	0.3 ± 0.6	4.0 ± 2.0	<0.001
CD3 ⁺ /CD57 ⁺	0	6.1 ± 1.9	<0.001

Subpoblaciones de linfocitos T CD3⁺ determinadas por citometría de flujo en sangre de cordón umbilical (n=15) y sangre periférica de adulto (n=10). Los resultados muestran el porcentaje medio ± ds de los distintos subgrupos CD3⁺ sobre el total de linfocitos, definidos como células de baja complejidad por SSC (*side-scatter*) y reactividad intensa para CD45.

Abreviaturas: SCU, sangre de cordón umbilical; SPA, sangre periférica de adulto; p, prueba de significación estadística (U de Mann-Whitney); NS, diferencia no significativa.

1.3.1.1.- Linfocitos T.

Se realizó un análisis posterior de las subpoblaciones de linfocitos T colaboradores (CD4⁺) y citotóxicos (CD8⁺). Así, la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ fue superior en SCU que en SPA, al tiempo que había menos linfocitos T CD8⁺, siendo la ratio CD4:CD8 mayor (Tabla 9).

TABLA 10. Linfocitos T CD4⁺ *naive*, memoria y transicionales de SCU. Comparación con SP del adulto

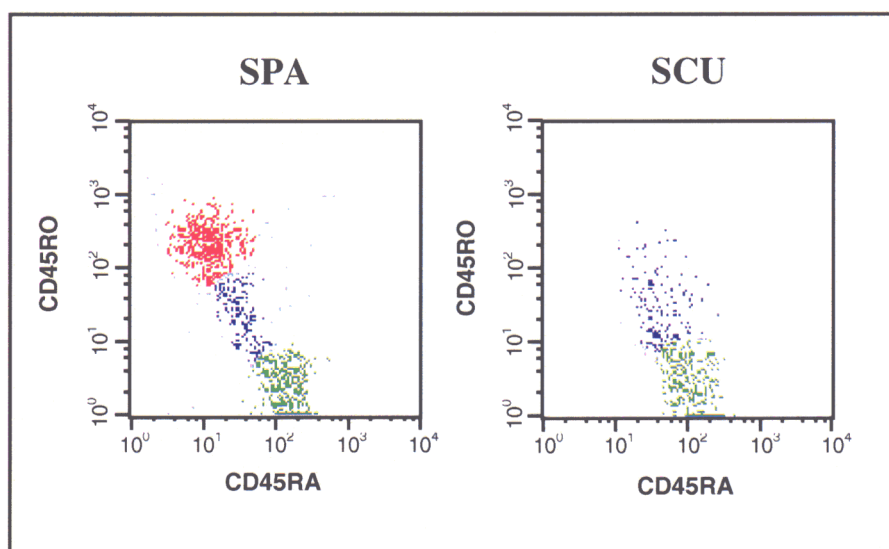
	SCU	SPA	p
CD4 ⁺ /CD45RA ⁺ (naive)	56.1 ± 2.7	11.4 ± 5.9	<0.001
CD4 ⁺ /CD45RA/RO ⁺ (transicional)	7.1 ± 3.6	11.8 ± 3.5	0.008
CD4 ⁺ /CD45RO ⁺ (memoria)	0.1 ± 0.1	24.3 ± 9.4	<0.001

Distribución de las isoformas CD45 en linfocitos T CD4⁺ por citometría de flujo en sangre de cordón umbilical (n=15) y sangre periférica de adulto (n=10), analizando la coexpresión de CD45RA y CD45RO. Los resultados muestran el porcentaje medio ± ds de los diferentes subgrupos CD4⁺ sobre el total de linfocitos definidos como células de baja complejidad por SSC (*side-scatter*) y reactividad intensa para CD45.

Abreviaturas: SCU, sangre de cordón umbilical; SPA, sangre periférica de adulto; p, prueba de significación estadística (U de Mann-Whitney).

La expresión de diferentes isoformas del antígeno CD45 en linfocitos T define el estado de madurez funcional, indicando si ha existido previamente exposición antigénica (células CD45RO⁺), o por el contrario aún no se ha producido una estimulación primaria por antígenos específicos (células CD45RA⁺). Al analizar los linfocitos T CD4⁺, se demostró una diferente distribución de las isoformas CD45 entre SCU y SPA, como se muestra en la tabla 10. En SCU,

FIGURA 2. Histogramas de fluorescencia de CD45 RA vs CD45RO en linfocitos T CD4⁺. SPA, sangre periférica de adulto; SCU, sangre de cordón umbilical; Puntos rojos, células CD45 RO⁺; Puntos verdes, células CD45RA⁺; Puntos azules, células CD45RA/RO⁺.



los linfocitos T $CD4^+$ coexpresaban predominantemente el antígeno CD45RA (células *naive*), mientras que solo se observó una proporción muy pequeña de células $CD45RO^+$ (células de memoria). La mayoría de los linfocitos $CD4^+/CD45RO^+$ de SCU también expresaban CD45RA (denominadas células T transicionales), lo que refleja células T recientemente estimuladas *in vivo*. Por el contrario, el estudio en SPA mostró la presencia de un mayor número de células $CD4^+/CD45RO^+$. En la figura 2 se muestra el patrón típico de expresión de las isoformas CD45 en linfocitos T $CD4^+$ de SCU y SPA.

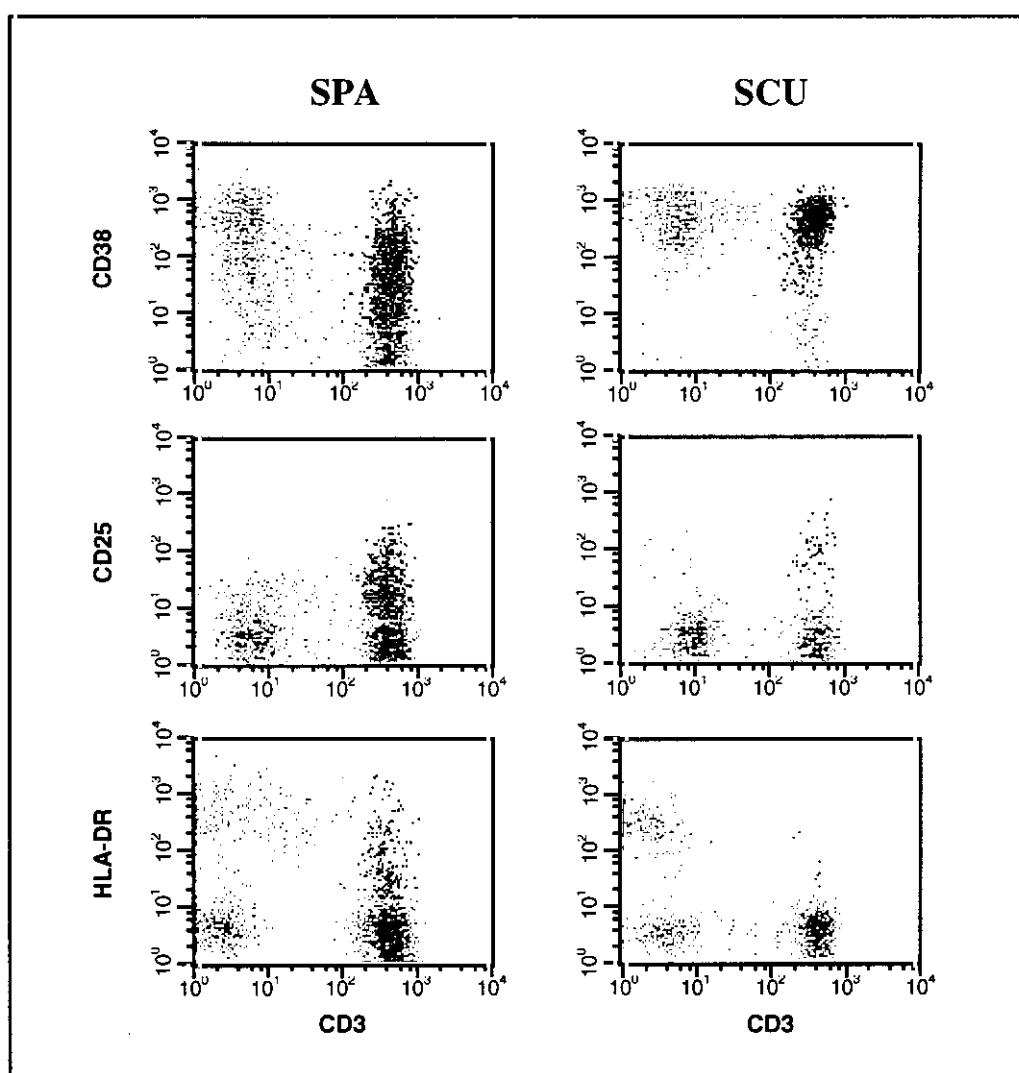


FIGURA 3. Histogramas de fluorescencia de CD3 vs CD38, CD25 y HLA-DR en linfocitos T. SPA, sangre periférica del adulto; SCU, sangre de cordón umbilical; Puntos negros, células $CD3^+$ que expresan CD38, CD25 o HLA-DR.

En SCU se encontraron células T $CD3^+/CD38^+$ en mayor abundancia que en SPA (Tabla 9). La expresión de CD38 puede indicar tanto inmadurez como activación de linfocitos T. Sin embargo, analizando otros marcadores de activación celular como son CD25 y HLA-DR, el número de linfocitos $CD3^+/CD25^+$ y $CD3^+/HLA-DR^+$ fue mayor en SPA que en SCU (Figura 3).

El antígeno CD57 fue negativo en los linfocitos T de SCU; además, se observó también una menor expresión de CD56 en estas células de SCU comparada con los linfocitos adultos $CD3^+$ (Tabla 9 y Figura 4). Ambos antígenos se expresan normalmente en células con una mayor actividad citotóxica, demostrándose por tanto con este análisis una diferencia fenotípica funcionalmente relevante en SCU respecto a SPA.

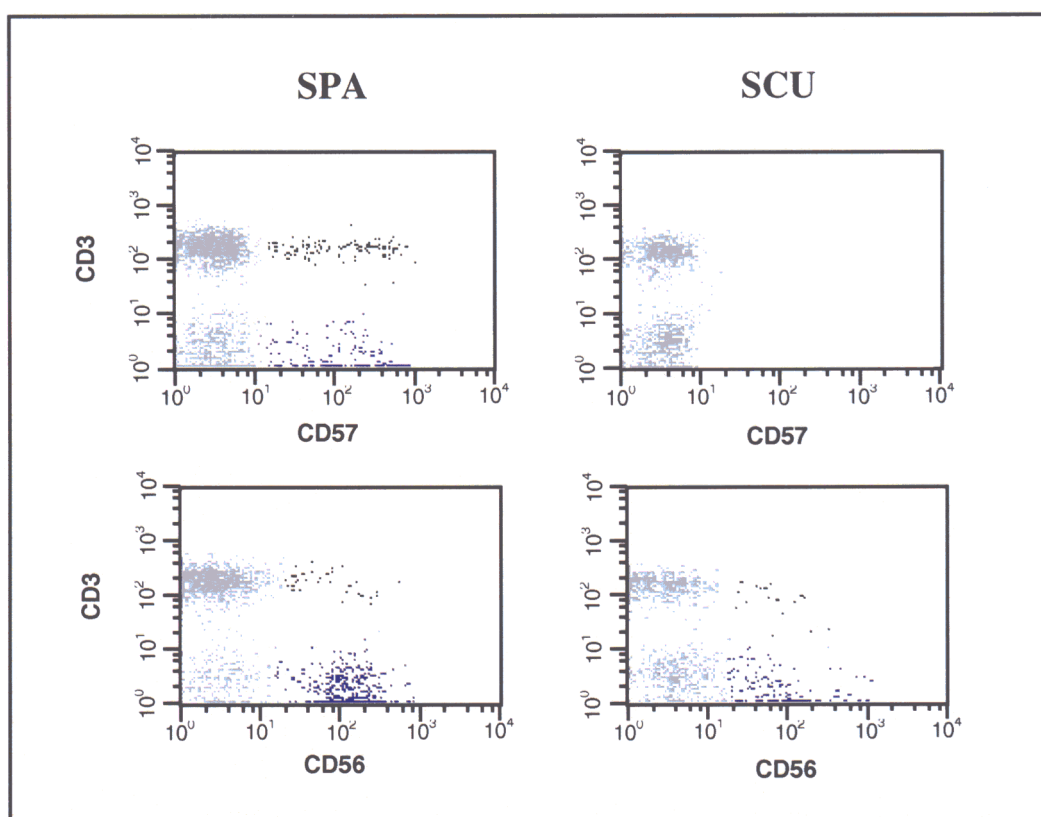


FIGURA 4. Histogramas de fluorescencia de CD57 y CD56 vs CD3. SPA, sangre periférica del adulto; SCU, sangre de cordón umbilical; Puntos negros, linfocitos T $CD3^+$ que expresan CD57 ó CD56; Puntos azules, células NK ($CD3^-$) que expresan CD57 ó CD56.

TABLA 11. Expresión de moléculas de adhesión en linfocitos T de SCU. Comparación con SP del adulto

	SCU	SPA	p
CD3 ⁺ /CD11a ⁺ (LFA-1)	71.9 ± 10.4	74.5 ± 3.8	NS
CD3 ⁺ /CD44 ⁺ (HCAM)	73.1 ± 11.2	74.7 ± 4.8	NS
CD3 ⁺ /CD54 ⁺ (ICAM-1)	2.1 ± 0.6	34.2 ± 16.1	<0.001
CD3 ⁺ /CD58 ⁺ (LFA-3)	0	42.2 ± 14.0	<0.001

Frecuencia de linfocitos T CD3⁺ determinada por citometría de flujo en sangre de cordón umbilical (n=15) y sangre periférica de adulto (n=10) que expresan las moléculas de adhesión LFA-1 (CD11a), HCAM (CD44), ICAM-1 (CD54) y LFA-3 (CD58). Los resultados muestran el porcentaje medio ± ds de los diferentes subgrupos CD3⁺ sobre el total de linfocitos definidos como células de baja complejidad por SSC (*side-scatter*) y reactividad intensa para CD45.

Abreviaturas: SCU, sangre de cordón umbilical; SPA, sangre periférica de adulto; p, prueba de significación estadística (U de Mann-Whitney); NS, diferencia no significativa.

Finalmente, hemos realizado un estudio de la expresión en linfocitos T de moléculas de adhesión que intervienen en la interacción celular y que pueden ser importantes en la capacidad aloreactiva linfocitaria. Las moléculas de adhesión LFA-3 (CD58) e ICAM-1 (CD54) estaban significativamente menos expresadas en linfocitos CD3⁺ de SCU, mientras que la expresión de LFA-1 (CD11a/CD18) y HCAM (CD44) era similar en SCU y SPA (Tabla 11), aunque se observó una densidad disminuida de LFA-1 en los linfocitos T de SCU en correlación con el fenotipo CD45RA.

1.3.1.2.- Linfocitos B.

En cuanto al análisis de poblaciones de linfocitos B, no se constataron diferencias con respecto al porcentaje de células CD19⁺ entre SCU y SPA. Sin embargo, casi el 90% de los linfocitos B de SCU expresaban el antígeno CD5, considerado como un marcador de inmadurez. No hubo tampoco diferencias en la expresión de HLA-DR ni de moléculas de adhesión entre ambas fuentes de células (Tabla 12).

TABLA 12. Análisis fenotípico de linfocitos B en SCU. Comparación con SP del adulto

Fenotipo	SCU	SPA	p
CD19 ⁺	12.0 ± 6.3	11.1 ± 2.8	NS
CD19 ⁺ /HLA-DR ⁺	12.1 ± 5.9	11.0 ± 2.8	NS
CD19 ⁺ /CD5 ⁺	10.9 ± 6.7	5.3 ± 2.1	0.002
CD19 ⁺ /CD11a ⁺ (LFA-1)	11.8 ± 6.7	11.1 ± 2.8	NS
CD19 ⁺ /CD44 ⁺ (HCAM)	11.1 ± 6.4	11.0 ± 2.8	NS
CD19 ⁺ /CD54 ⁺ (ICAM-1)	10.5 ± 8.1	10.6 ± 2.8	NS
CD19 ⁺ /CD58 ⁺ (LFA-3)	3.1 ± 4.9	3.2 ± 1.8	NS

Subpoblaciones de linfocitos B CD19⁺ determinadas por citometría de flujo en sangre de cordón umbilical (n=15) y sangre periférica de adulto (n=10), analizando la coexpresión de HLA-DR, CD5 y moléculas de adhesión LFA-1 (CD11a), HCAM (CD44), ICAM-1 (CD54) y LFA-3 (CD58). Los resultados muestran el porcentaje medio ± ds de los diferentes subgrupos CD19⁺ sobre el total de linfocitos definidos como células de baja complejidad por SSC (*side-scatter*) y reactividad intensa para CD45.

Abreviaturas: SCU, sangre de cordón umbilical; SPA, sangre periférica de adulto; p, prueba de significación estadística (U de Mann-Whitney); NS, diferencia no significativa.

1.3.1.3.- Células NK.

El porcentaje de células NK en SCU y SPA fue similar (Tabla 13). Como se ha mencionado previamente, la expresión de antígenos CD56 y CD57 se asocia con una mayor actividad citotóxica celular. La subpoblación de células NK CD16⁺/CD56⁻ encontrada en SCU fue superior a la de SPA. De forma similar a los hallazgos descritos en linfocitos T, las células NK de SCU no expresaban CD57, y la expresión de CD56 era de menor densidad que la observada en las células NK de SPA (Figura 4).

De los datos expuestos, se puede concluir que las poblaciones linfocitarias de SCU muestran una relativa inmadurez y una menor expresión de marcadores de actividad citotóxica, siendo los linfocitos T en SCU predominantemente células *naive*.

TABLA 13. Análisis fenotípico de linfocitos NK en SCU. Comparación con SP del adulto

Fenotipo	SCU	SPA	p
CD7 ⁺ /CD3 ⁻	14.4 ± 4.4	11.4 ± 6.8	NS
CD7 ⁺ /CD3 ⁻ /CD16 ⁺	13.2 ± 4.4	11.9 ± 4.7	NS
CD7 ⁺ /CD3 ⁻ /CD56 ⁺	8.5 ± 3.9	12.8 ± 6.1	0.01
CD7 ⁺⁺ /CD16 ⁺ /CD56 ⁻ (*)	4.5 ± 3.8	0.7 ± 0.3	0.001
CD7 ⁺ /CD3 ⁻ /CD57 ⁺	0	8.7 ± 5.0	<0.001

Subpoblaciones de linfocitos natural killer (NK) CD7⁺/CD3⁻ determinadas por citometría de flujo en sangre de cordón umbilical (n=15) y sangre periférica de adulto (n=10), analizando la coexpresión de CD16, CD56 y CD57. * En esta combinación las células NK han sido seleccionadas por la expresión intensa de CD7, además de CD16. Los resultados muestran el porcentaje medio ± ds de los diferentes subgrupos CD7⁺/CD3⁻ sobre el total de linfocitos definidos como células de baja complejidad por SSC (*side-scatter*) y reactividad intensa para CD45.

Abreviaturas: SCU, sangre de cordón umbilical; SPA, sangre periférica de adulto; p, prueba de significación estadística (U de Mann-Whitney); NS, diferencia no significativa.

1.3.2.- Producción de citocinas por linfocitos T.

Un ensayo *in vitro* que reproduce el proceso de activación de linfocitos T, es la estimulación con ésteres de forbol e ionomicina, que, de forma conjunta, estimulan la expresión y secreción de citocinas mediadoras de respuesta inmune. En nuestro caso, tras la incubación con estas dos sustancias activadoras de células T, más del 90% de los linfocitos en SCU y SPA expresaron en todos los experimentos realizados el marcador de activación precoz CD69, lo cual permite afirmar que la activación indujo en la mayoría de los linfocitos una estimulación eficiente. Añadiendo un agente inhibidor del tráfico intracelular de proteínas, como es la brefeldina, las citocinas producidas tras la estimulación se retienen en el interior de la célula, y pueden así ser fácilmente detectadas por citometría de flujo.

En la figura 5 se compara la expresión intracelular de IL-2, IL-4 e IFN- γ en dos muestras de linfocitos T de SCU y SPA. En este experimento representativo se comprueba una producción

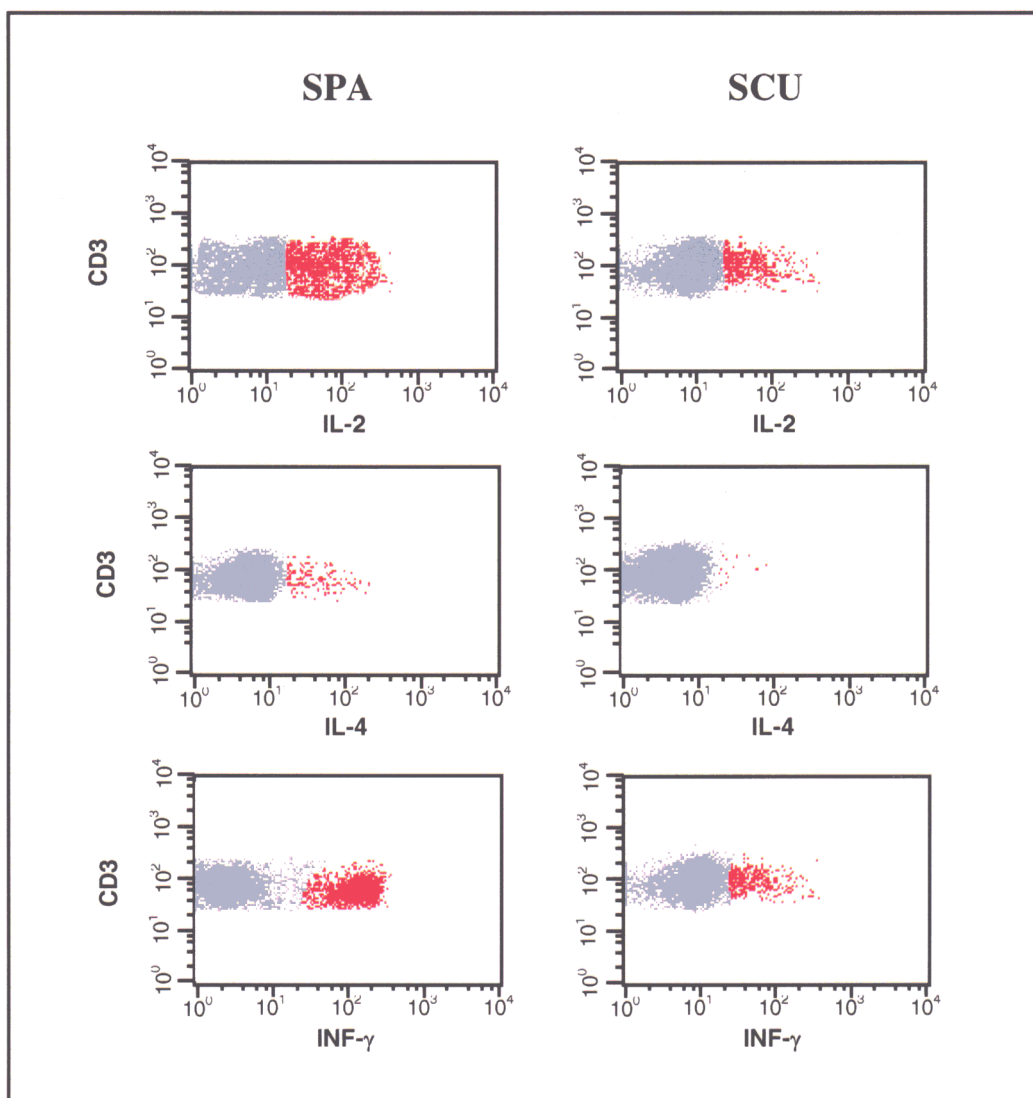


FIGURA 5. Histogramas de fluorescencia de IL-2, IL-4 y INF- γ vs CD3. SPA, sangre periférica de adulto; SCU, sangre de cordón umbilical. Puntos rojos, células CD3⁺ que expresan IL-2, IL-4 o INF- γ .

disminuida de IL-2, IL-4 e INF- γ en linfocitos T de SCU respecto a linfocitos T de SPA. Los resultados obtenidos en ocho muestras de SCU y diez muestras de SPA se resumen en la figura 6, donde se observa un porcentaje significativamente menor de células CD3⁺ productoras de IL-2, IL-4 e INF- γ en SCU en comparación con SPA.

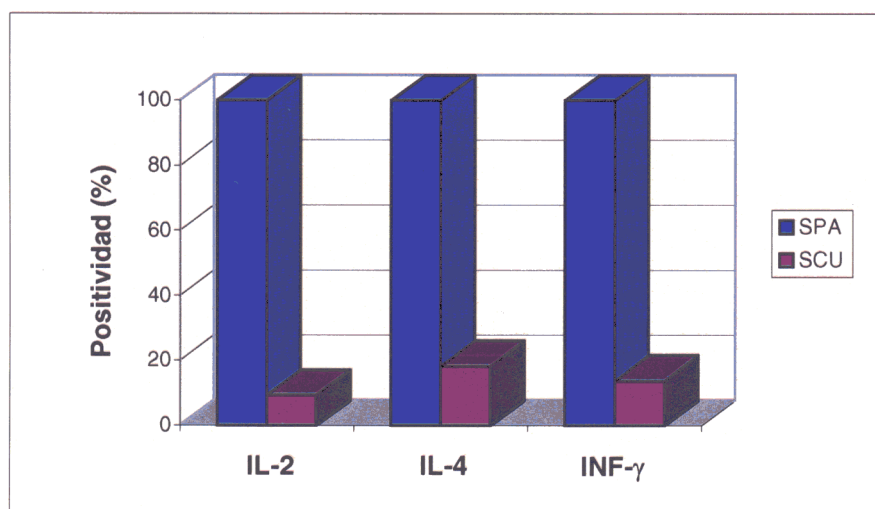


FIGURA 6. Expresión de IL-2, IL-4 e IFN-γ en linfocitos T CD3⁺ activados con ésteres de forbol e ionomicina. Los resultados muestran el porcentaje de positividad en linfocitos CD3⁺ de SCU (n=8) y SPA (n=10), habiendo sido normalizados los valores de SCU respecto a los de SPA (100%). Las diferencias son significativas en las tres citocinas estudiadas ($p < 0.001$, U de Mann-Whitney).

Las subpoblaciones de linfocitos T principalmente responsables de la producción de citocinas fueron determinadas mediante análisis fenotípico basado en la expresión de CD4 y CD8 (Tabla 14). En SCU, las células que producen IL-2 fueron mayoritariamente linfocitos CD4⁺ (83% vs 17%). De igual forma, las citocinas IL-4 e IFN-γ fueron producidas principalmente por células CD4⁺, en comparación con los linfocitos T CD8⁺ (81% vs 19% y 67% vs 33%, respectivamente). En SPA, las citocinas IL-2 e IL-4 también fueron producidas predominantemente por células CD4⁺ (81% vs 19% y 83% vs 17%). Sin embargo, la producción de IFN-γ se detectó tanto en células CD4⁺ como CD8⁺ (48% vs 52%).

En resumen, las características fenotípicas y funcionales distintivas de SCU evidencian un estado de inmadurez relativa del sistema inmune neonatal. La presencia de una mayor proporción en SCU de linfocitos T CD4⁺ que expresan CD45RA, la coexpresión en la mayoría de linfocitos CD4⁺/CD45RO⁺ del isotipo CD45RA (células transicionales) y la mayor expresión de CD38 sin que existan signos de activación T (CD25 o HLA-DR) son hallazgos consistentes con células T que no han tenido todavía una exposición primaria antigénica (células no primadas o *naive*). La actividad citotóxica y la capacidad aloreactiva probablemente son también inferiores en los linfocitos T de SCU, según se deduce de la casi completa ausencia de antígenos

TABLA 14. Expresión de citocinas en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de SCU. Comparación con SP del adulto

	SCU	SPA	p
CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /IL-2 ⁺	2.9 ± 1.1	30.9 ± 7.3	<0.01
CD3 ⁺ /CD8 ⁺ /IL-2 ⁺	0.5 ± 0.3	5.9 ± 1.7	<0.01
CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /IL-4 ⁺	0.3 ± 0.2	2.0 ± 0.5	<0.01
CD3 ⁺ /CD8 ⁺ /IL-4 ⁺	0.1 ± 0.4	0.2 ± 0.3	<0.01
CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /IFN-γ ⁺	2.0 ± 1.5	8.2 ± 2.3	<0.01
CD3 ⁺ /CD8 ⁺ /IFN-γ ⁺	0.5 ± 0.6	10.0 ± 4.7	<0.01

Células T CD3⁺ productoras de citocinas caracterizadas por citometría de flujo en sangre de cordón umbilical (n=8) y sangre periférica de adulto (n=10), de acuerdo con la expresión de CD4 y CD8 y la detección intracelular de IL-2, IL-4 e IFN-γ tras estimulación con ésteres de forbol e ionomicina. Los resultados muestran el porcentaje medio ± ds de positividad sobre el total de linfocitos T definidos como células de baja complejidad por SSC (*side-scatter*) y expresión de CD3.

Abreviaturas: SCU, sangre de cordón umbilical; SPA, sangre periférica de adulto; p, prueba de significación estadística (U de Mann-Whitney).

CD56 y CD57 y de la menor proporción de linfocitos T que expresan moléculas de adhesión LFA-3 e ICAM-1. Igualmente, la detección de células NK CD16⁺/CD56⁻ en SCU, prácticamente inexistentes en SPA, se corresponde con una menor actividad lítica NK de SCU, repetidamente demostrada en estudios funcionales. Por último, la menor proporción de células capaces de producir citocinas implicadas en reacciones proinflamatorias (IL-2 e IFN-γ) está en concordancia con la inmadurez (CD45RA) de los linfocitos T de SCU, los cuales no han sido aún activados hacia células tipo T_H1 (secretoras de IL-2 e IFN-γ) o T_H2 (secretoras de IL-4).

2.- CRITERIOS DE SELECCIÓN DE DONANTES DE SCU.

Una de las prioridades más importantes de un Banco de SCU es procurar la máxima seguridad a las madres que aceptan donar la sangre de cordón de su hijo, y proteger a los pacientes que eventualmente reciban un trasplante de SCU. Para ello, la selección de los posibles donantes de SCU debe ser muy estricta, siendo necesario en primer lugar facilitar a la madre/donante una información adecuada de los propósitos del programa y de los requerimientos que su participación en el mismo le supone, y asegurar su conformidad por escrito mediante la firma del consentimiento informado para la donación de SCU. Además, cuando existen complicaciones durante el parto, puede existir algún riesgo para el recién nacido o la madre si se procede a la recogida de SCU, por lo que en estas circunstancias debe desestimarse la donación de SCU. En tercer lugar, debe descartarse toda posibilidad de transmisión de enfermedades a los pacientes que reciben sangre de cordón, investigando los antecedentes familiares del donante y detectando en la madre y en la SCU la presencia de posibles infecciones o trastornos hereditarios transmisibles.

Este proceso de selección se inicia en el primer contacto con la madre a la que se propone participar en el programa, comprobando si existe algún criterio de exclusión que impida la donación de SCU (ver Anexo III). Tiene en cuenta las características del parto y el estado del feto, descartando situaciones obstétricas que contraindiquen el procedimiento de recogida de SCU. Por último, incluye sendas revisiones del estado del recién nacido y de la madre, la primera inmediatamente después del parto, y la segunda tres meses después de la donación. De esta forma, se garantiza la idoneidad de las unidades que se obtienen y que finalmente son inventariadas en el Banco de SCU, al tiempo que se preserva la seguridad de las madres que consienten voluntariamente en la donación de SCU.

En los puntos siguientes se detallan las exclusiones que han sido aplicadas antes, inmediatamente después y en el control realizado a los tres meses de la donación de SCU, haciendo mención de aquellas alteraciones que no hemos considerado motivo de exclusión. Se describe también la experiencia propia con algunas de las pruebas realizadas en cuanto al valor

de las mismas en proporcionar mayor seguridad a las unidades de SCU disponibles para trasplante.

2.1.- Exclusiones predonación.

El programa de Banco de SCU fue iniciado en octubre de 1995. Hasta marzo de 1998 se entrevistaron en el momento inmediatamente anterior al parto 439 mujeres embarazadas, candidatas potenciales para la donación de SCU. Trescientas madres (68%) cumplían todos los criterios de inclusión (ver apartado 2.1. de Materiales y Métodos) y fueron aceptadas como donantes de SCU. Ciento treinta y nueve (32%) fueron excluidas por los motivos expresados en la tabla 15.

Los tres grupos de causas más frecuentes que impidieron la donación de SCU fueron problemas de naturaleza obstétrica (27.3%), la infección potencial de SCU (18.7%) y el sufrimiento fetal (12.2%). Dentro de las causas obstétricas, las más frecuentes fueron cesárea, parto instrumental y periodo expulsivo rápido. Se desestimó la obtención de SCU en las cesáreas y partos instrumentales fundamentalmente para no interferir con una maniobra adicional que pudiera suponer una dificultad añadida a una situación obstétrica más compleja de lo habitual. La posibilidad de infección de la SCU vino motivada principalmente por una rotura de bolsa amniótica de más de 12 horas de duración y por la presencia de fiebre materna durante el parto, circunstancias que se asocian con riesgo de sepsis neonatal. El sufrimiento fetal fue detectado clínicamente (alteraciones en la frecuencia cardíaca o en el pH arterial), o por la presencia de meconio en el líquido amniótico. El resto de causas descritas fueron incidentalmente marginales, incluyendo un 3% de enfermedades hereditarias en la familia, y hubo un porcentaje significativo de madres en las que no se procedió a la recogida de SCU sin que se refiriera ningún motivo concreto por parte del personal de obstetricia encargado de la recolección. Un 12% de las exclusiones fueron debidas a denegación del consentimiento informado.

TABLA 15. Selección de donantes de SCU. Incidencia y causas de exclusión.

Exclusión	Incidencia (%)
<i>Denegación de consentimiento</i>	17 (12.2)
<i>Infección potencial de SCU</i>	26 (18.7)
Bolsa rota > 12 horas	13
Fiebre materna	7
Serología rubeola (IgM) positiva (madre)	1
Infección perineal	1
Herpes cervix uterino	1
Serología VIH positiva (madre)	1
Embarazo no controlado	1
Hepatitis C crónica (padre)	1
<i>Sufrimiento fetal</i>	17 (12.2)
Sospecha clínica	7
Meconio en líquido amniótico	10
<i>Causas obstétricas</i>	38 (27.3)
Cesárea	16
Periodo expulsivo rápido	7
Parto instrumental	10
Vuelta de cordón	1
Embarazo gemelar	1
Hipertensión arterial	3
<i>Antecedentes de enfermedades genéticas</i>	4 (2.9)
Traslocación t(13;14)	1
Fenilcetonuria	1
Trisomía 21 (S. Down)	1
Trombocitopenia hereditaria	1
<i>Motivos religiosos</i>	1 (0.7)
<i>Exclusión errónea</i>	4 (2.9)
<i>Causa no reportada</i>	32 (23)
<i>Total exclusiones</i>	139 (100)
<i>Donaciones</i>	300

De 439 mujeres embarazadas, 139 (32%) fueron excluidas para la donación por los motivos indicados en la tabla, procediéndose a la obtención de SCU en 300 (68%).

2.2.- Exclusiones en el periodo inmediato postparto.

Una vez recogida la SCU, se realizó una investigación dirigida a descartar posibles enfermedades transmisibles de naturaleza infecciosa o hereditaria. Para ello se practicaron controles microbiológicos tanto en la unidad de SCU (cultivos bacterianos aerobios y anaerobios) como en el suero materno (serología vírica y parasitaria), además de una revisión del estado clínico del recién nacido y de la historia familiar para identificar trastornos genéticos no detectados previamente.

2.2.1.- Infecciones bacterianas.

Durante la obtención de SCU es posible la contaminación por gérmenes habituales de la región perineal (flora recto-vaginal), originada básicamente por la entrada de bacterias en el sistema de recolección durante la punción de la vena umbilical o la canalización de los vasos placentarios. A pesar de las medidas preventivas de esterilización del lugar de punción, existe un cierto número de unidades recolectadas en las que se detectan cultivos positivos para bacterias aerobias y/o anaerobias.

TABLA 16. Contaminación bacteriana en SCU

Aerobios	Nº Unidades	Anaerobios	Nº Unidades
<i>Estafilococo epidermidis</i>	7	<i>Bacteroides fragilis</i>	4
<i>Streptococo agalactiae</i>	4	<i>Bacillus sp</i>	2
<i>Escherichia Coli</i>	2	<i>Difteroides</i>	1
<i>Streptococo viridans</i>	1	<i>Enterococo faecalis</i>	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	<i>Pediococus</i>	1
<i>Lactobacillus sp</i>	1	<i>Fusobacterium</i>	1
Flora mixta gram negativa	1	<i>Peptoestreptococo</i>	1
		<i>Micrococus sp</i>	1
Total	17 (5.6%)	Total	11 (3.6%)

Los resultados indican el número de unidades de SCU positivas para gérmenes aerobios o anaerobios.

Entre paréntesis se indica el porcentaje de contaminación bacteriana (n=300).

La incidencia de contaminación por bacterias aerobias y anaerobias en las 300 unidades de SCU analizadas se muestra en la tabla 16. Un total de 28 unidades (9.2%) fueron positivas, no existiendo una incidencia significativamente superior de contaminación por gérmenes aerobios o anaerobios. La contaminación por *Estafilococo epidermidis* y *Streptococo agalactiae* fueron las más frecuentes dentro del grupo aerobio, y la originada por *Bacteroides fragilis* fue la más frecuente en el grupo anaerobio. Durante el proceso final de validación, todas estas unidades positivas fueron consideradas no elegibles para trasplante y, por tanto, desechadas del inventario del Banco.

2.2.2.- Infecciones víricas y parasitarias.

Por otro lado, puede existir antes o durante el parto una transmisión materno-fetal de infecciones activas de naturaleza vírica o parasitaria. Según la legislación vigente, es obligatorio realizar estudios de serología en el suero de la madre que descarten la existencia de anticuerpos

TABLA 17. Incidencia de anticuerpos virales y parasitarios en las madres/donantes de SCU

Test serológico	Incidencia (%)
HBsAg	1 (0.3)
Anti-VHC	3 (1)
Anti-VIH 1/2	0
TPHA	0
Anti-Toxoplasma (IgG)	62 (21)
Anti-CMV (IgG)	255 (85)

Los resultados (n=300) indican el número de sueros maternos positivos (entre paréntesis, porcentaje de positividad), analizados el día de la donación de SCU (día 0).

Abreviaturas: HBsAg, test de enzima-inmuno-análisis (EIA) para el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B; Anti-VHC, test de EIA para anticuerpos anti-virus de la hepatitis C; Anti-VIH 1/2, test de EIA para anticuerpos anti-virus de la inmunodeficiencia humana 1 y 2; TPHA, test de hemaglutinación para anticuerpos anti-*Treponema pallidum*; Anti-Toxoplasma (IgG), test de EIA para anticuerpos IgG anti-toxoplasma; Anti-CMV (IgG), test de EIA para anticuerpos IgG anti-citomegalovirus.

frente a virus de la hepatitis B y hepatitis C, virus de inmunodeficiencia humana adquirida (VIH) y sífilis. De forma adicional, analizamos la presencia de anticuerpos frente a citomegalovirus (CMV) y toxoplasma, dos de las infecciones congénitas más frecuentes en países desarrollados.

Los resultados de la serología realizada en el suero de la madre el día del parto se muestran en la tabla 17. Aunque la muestra estudiada fue relativamente pequeña, la incidencia de positividad para el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B y de anticuerpos frente al virus de la hepatitis C fue superponible a la detectada en una población normal de donantes de sangre, y supone por tanto una pérdida escasa de unidades de SCU procesadas que, por esta razón, fueron desechadas del Banco. Ninguna madre/donante fue positiva para VIH ni *Treponema pallidum*.

La positividad para CMV y toxoplasma fue documentada en el rango de incidencia descrito en nuestro ámbito poblacional (Pérez-Rivilla y cols., 1996), detectándose en todos los casos anticuerpos IgG y nunca IgM. Este dato, combinado con la ausencia de elevación del título de anticuerpos IgG en el análisis realizado 90 días después del parto (ver más adelante apartado 2.3.), y la no evidencia de manifestaciones clínicas de infección congénita por CMV o toxoplasma en ninguno de los recién nacidos, indica un estado de inmunización materna consecutiva a una infección antigua, no activa durante el embarazo. No se descartó, por tanto, ninguna unidad de SCU en base a esta positividad para anticuerpos IgG frente a CMV o toxoplasma.

TABLA 18. Enfermedades hereditarias o congénitas detectadas en el día 0 y día 90

	Patología	Incidencia
Día 0	Déficit de colinesterasa	1
	Malformación renal (riñón doble)	2
Día 90	β -talasemia heterozigota	1
	Fibrosis quística	1

2.2.3.- Enfermedades hereditarias.

Solamente se detectó un caso de deficiencia de colinesterasa en la investigación realizada en el momento del nacimiento (Tabla 18). Además de este trastorno hereditario, dos recién nacidos eran portadores de malformaciones congénitas del aparato urinario (riñón doble). Ninguna de estas alteraciones fueron consideradas causas de exclusión de la unidad de SCU, ya que no son transmisibles con un eventual trasplante de sangre de cordón umbilical.

2.3.- Control a los 90 días del parto.

Para aumentar la seguridad de la unidades depositadas en el Banco, y siguiendo las medidas adoptadas en otros bancos de SCU, se estableció un control a los 90 días del parto en el que se revisaron los antecedentes familiares, se realizó un segundo estudio serológico en la madre y se comprobó el estado físico del niño. El objetivo fue descartar posibles infecciones maternas adquiridas en fechas próximas al parto y que pudieran pasar serológicamente desapercibidas (periodo ventana), así como posibles trastornos de carácter hereditario no detectados en el examen practicado al recién nacido o no identificados durante la anamnesis realizada inicialmente. A pesar de que el criterio para mantener este control no es homogéneo, nosotros lo consideramos con el fin de comprobar la necesidad o no de llevarlo a cabo.

2.3.1.- Tasa de cumplimentación.

Como puede apreciarse en la tabla 19, solo un 41% de las madres acudieron a este control de cuarentena, cifra acorde con la experiencia comunicada por otros bancos de SCU.

2.3.2.- Infecciones víricas y parasitarias.

La tasa de seroconversiones a los 90 días del parto fue de un 7.3% (Tabla 19), la mayoría consistente en títulos bajos de IgG para toxoplasma y citomegalovirus. Muy posiblemente, estas “seroconversiones” no son realmente primoinfecciones sino que se trata de madres previamente

TABLA 19. Control al día 90 de la donación de SCU.
Tasa de seroconversiones y de resolución del tipaje HLA

	Incidencia (%)
Cumplimiento (n=300)	123 (41)
Seroconversiones (n=123)	9 (7.3)
Anti-VHC	1
Anti-Toxoplasma (IgG)	3
Anti-CMV (IgG)	5
Resolución tipaje HLA (n=100)	42 (42)

Cumplimiento: número de madres que realizan el control del día 90; Seroconversiones: número de madres negativas a día 0 y positivas a día 90; Resolución tipaje HLA: número de unidades de SCU en las que el tipaje HLA no se pudo definir en la muestra de SCU y sí al realizar el estudio HLA en los padres.

Abreviaturas: Anti-VHC, test de EIA para anticuerpos anti-virus de la hepatitis C; Anti-Toxoplasma (IgG), test de EIA para anticuerpos IgG anti-toxoplasma; Anti-CMV (IgG), test de EIA para anticuerpos IgG anti-citomegalovirus.

inmunizadas como consecuencia de una infección antigua, con niveles séricos de anticuerpos muy próximos al umbral de detección por enzima-inmuno-análisis y que no fueron detectados en el análisis coincidente con el parto. Por ello, estas unidades de SCU no fueron consideradas como rechazables y se han mantenido en el Banco. Solo hubo un caso de hepatitis C positivo en este control, habiendo sido negativo en el momento de la donación. Esta unidad fue desechada del inventario del Banco.

2.3.3.- Enfermedades hereditarias.

En cuanto a enfermedades hereditarias, se identificaron dos casos que no se habían detectado en el momento del nacimiento, una β -talasemia heterozigota en la madre y una fibrosis quística en una hermana del recién nacido (Tabla 18). En el primer caso, la unidad está debidamente identificada para ser empleada únicamente en el trasplante de pacientes no talasémicos. La segunda unidad tampoco fue rechazada al tratarse de una enfermedad no transmisible por el tejido hematopoyético.

2.3.4.- Confirmación del tipaje HLA mediante el haplotipo materno.

Una ventaja adicional y no menos importante de cumplimentar este control postparto es la realización del estudio HLA materno, que en ocasiones puede llegar a ser especialmente útil. La tipificación HLA en el periodo postparto puede verse dificultada por la presencia de anticuerpos anti-HLA, circunstancia que ocurre hasta en el 17% de las madres (Clay y cols., 1984). Por este motivo, preferimos diferir el análisis a los tres meses después del parto, con objeto de que la concentración de anticuerpos en las madres positivas haya descendido hasta títulos que no interfieran con la determinación HLA.

El conocimiento de los alelos HLA maternos facilita, en primer lugar, la confirmación del tipaje HLA realizado en la SCU, al comprobarse la identidad del haplotipo materno. Además, puede ayudar a definir las variantes no resueltas en la tipificación inicial de la SCU. Por último, existen con cierta frecuencia dificultades en el tipaje serológico de sangre de cordón debidas a una menor expresión de antígenos HLA en células fetales (Puri y cols., 1993) y, en estos casos dudosos, el conocimiento del haplotipo materno puede suponer la caracterización definitiva del tipaje HLA. La resolución del tipaje de SCU derivada del conocimiento de los alelos HLA de la madre se produjo en el 42% de las unidades de SCU en nuestra serie (Tabla 19).

3.- ESTANDARIZACIÓN DE LOS MÉTODOS DE OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LA SCU.

Con la selección cuidadosa de los donantes de SCU se ejerce un primer control dirigido a conseguir la mayor calidad y seguridad posibles de las unidades que van a formar parte del Banco. No menos importante para este fin, es la optimización de los procedimientos de obtención, fraccionamiento y criopreservación de la SCU, de forma que las unidades recogidas contengan el máximo número de células viables, se pierda el menor número de progenitores hematopoyéticos durante el procesamiento de las mismas y se preserve la viabilidad celular al final de la congelación, al tiempo que se procure un aprovechamiento máximo del espacio disponible para almacenamiento en nitrógeno líquido de las unidades criopreservadas.

En este apartado se expone el trabajo de estandarización de los métodos de procesamiento de las unidades de SCU realizado en nuestro Banco. Hemos comparado los resultados obtenidos con las distintas técnicas de recogida, fraccionamiento, criopreservación y descongelación de SCU empleadas, de forma que, tras la identificación de los mejores procedimientos, el estudio realizado ha dado lugar a la adopción de los métodos más idóneos con los que en la actualidad se procesan en el Banco las unidades de SCU.

3.1.- Optimización del procedimiento de obtención de SCU.

El parámetro más predictivo de la probabilidad y velocidad de implante hematopoyético en el trasplante de SCU es la dosis celular infundida (células nucleadas infundidas por kilogramo de peso del receptor). La celularidad de las unidades de SCU es muy variable, y no todas contienen un número suficiente de células, especialmente cuando se pretende realizar trasplantes en pacientes adultos. De hecho, el análisis retrospectivo de trasplantes de SCU muestra un mayor éxito de recuperación hematopoyética en la población infantil respecto a la adulta, fundamentalmente debido a que la dosis celular empleada en individuos adultos es menor (Gluckman y cols., 1997; Rubinstein y cols., 1998).

Por ello, y con objeto de proveer unidades óptimas de SCU no solo en niños sino también en adultos, es fundamental que parte del esfuerzo de un banco de SCU esté dirigido a que las unidades almacenadas sean de la mayor riqueza celular posible. El número total de células en una unidad de SCU depende de la concentración celular y del volumen recogido. A su vez, entre los factores que pueden influir en el volumen de las unidades de SCU, junto a variables como el peso del recién nacido y el número de gestaciones (ver más adelante apartado 3.4.), el procedimiento de obtención empleado puede ser determinante.

Las unidades de SCU analizadas en este estudio consisten en la combinación de dos fracciones de sangre fetal, recogidas individualmente. La primera fracción, siguiendo el procedimiento habitualmente utilizado por la mayoría de bancos de SCU, se obtiene mediante punción de la vena umbilical, dejando fluir la sangre por gravedad. De forma adicional, recogimos una segunda fracción realizando una perfusión arteriovenosa de la placenta (ver técnica de obtención en apartado 2.2 de Materiales y Métodos), tratando así de obtener una cantidad complementaria de sangre neonatal y aumentar la riqueza celular de las unidades de SCU.

3.1.1.- Volumen y celularidad total de las unidades de SCU.

Con este procedimiento de obtención, el volumen de sangre efectivo (sin contar el anticoagulante presente en las bolsas de recogida) fue 131.68 ± 46.77 ml, con un rango de 38 a 290 ml (Tabla 20). El volumen medio de las unidades de nuestra serie fue entre un 18% y un 79% superior al comunicado por la mayoría de bancos de SCU (Querol y cols., 1998; Navarrete y cols., 1998., Dal Cortivo y cols., 1998; Pojda y cols., 1998; Kogler y cols., 1998b), en los que la recogida se realiza únicamente por venopunción.

La concentración de células nucleadas y células mononucleadas (linfocitos, monocitos y células grandes no teñidas [células LUC]) fue 9.55 ± 3.68 y $3.5 \pm 1.37 \times 10^9$ /L, respectivamente. Estas cifras se correspondieron con unos valores absolutos de $1.22 \pm 0.51 \times 10^9$ células nucleadas y

TABLA 20. Volumen y celularidad de SCU

	Volumen	C. Nucleadas		C. Mononucleadas		
	(ml)	Concentración ($\times 10^9/l$)	Total ($\times 10^9$)	Porcentaje (%)	Concentración ($\times 10^9/l$)	Total ($\times 10^9$)
media	131.68	9.55	1.22	39.06	3.50	0.44
ds	46.77	3.68	0.51	8.48	1.37	0.18
extremos	38 - 290	2.76 - 31.35	0.34 - 3.43	23 - 65	1.44 - 11.21	0.13 - 1

Los resultados muestran el análisis realizado sobre 300 unidades de SCU. Volumen: volumen efectivo de la unidad de sangre de cordón umbilical (volumen total – volumen de anticoagulante); C. Nucleadas: concentración y número absoluto de células nucleadas; C. Mononucleadas: porcentaje, concentración y número absoluto de células mononucleadas.

Abreviaturas: SCU, sangre de cordón umbilical; ds, desviación estándar.

$0.44 \pm 0.18 \times 10^9$ células mononucleadas (Tabla 20). Análogamente a lo que sucede con el volumen, la celularidad total media fue entre un 16% y un 20% superior al contenido de células nucleadas de las unidades obtenidas en otros bancos de SCU (Querol y cols., 1998; Navarrete y cols., 1998; Kogler y cols., 1998b).

El volumen de SCU mostró una correlación significativa con el contenido de células nucleadas (Figura 7, coeficiente de correlación de Pearson, $r=0.62$), lo cual subraya la importancia de optimizar el procedimiento de recogida con el fin de lograr el mayor volumen posible de sangre umbilico-placentaria y, por tanto, unidades de SCU con mayor riqueza celular. Los resultados aquí descritos sugieren que la recogida complementaria de sangre mediante perfusión de la placenta, además de la obtenida por punción de la vena umbilical, supone una aportación en volumen y celularidad cuantitativamente relevante. Para determinar la contribución exacta de esta segunda fracción en la celularidad final, hemos realizado un análisis por separado del volumen y número de células nucleadas en la sangre obtenida por venopunción y en la sangre obtenida tras perfusión de la placenta.

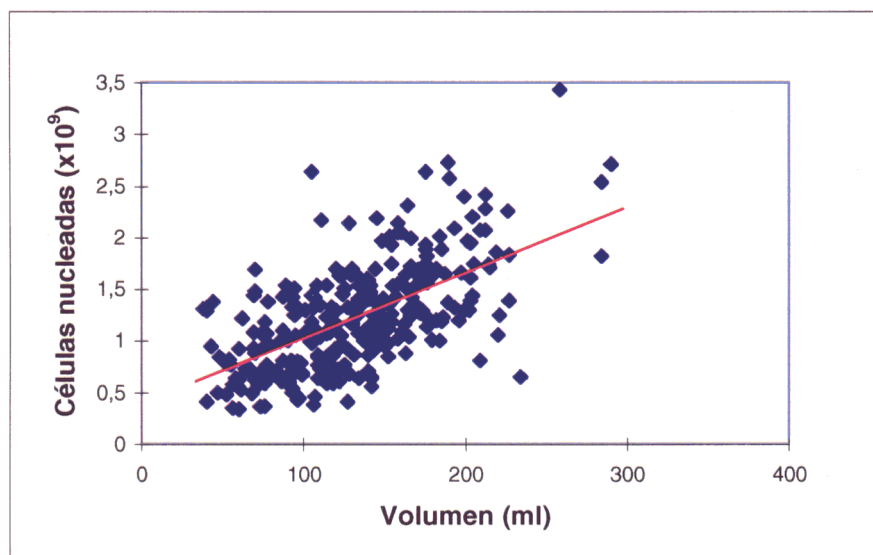


FIGURA 7. Correlación entre el volumen y las células nucleadas de SCU. Coeficiente de correlación de Pearson, $r=0.62$ ($n=300$).

3.1.2.- Recogida de SCU mediante punción de la vena umbilical.

La primera fracción de sangre de cordón contenía la mayor parte de las células nucleadas (85%) y del volumen (65%) de las unidades de SCU: $1.07 \pm 0.45 \times 10^9$ células y 87.3 ± 35.2 ml, respectivamente (Tabla 21). Estas cifras fueron superponibles a las descritas por otros grupos que solamente obtienen sangre de cordón tras venopunción (Querol y cols., 1998; Navarrete y cols., 1998.; Kogler y cols., 1998b). Solo el 30% de las unidades contenían en esta primera fracción un número igual o superior a 1.3×10^9 células.

3.1.3.- Obtención complementaria de SCU mediante perfusión de la placenta.

El rendimiento de la segunda fracción de SCU fue analizado en 44 unidades, mostrándose los resultados de este estudio en las tablas 21 y 22. Como se puede observar, el volumen de esta segunda fracción de sangre obtenida tras perfundir la placenta con 50 ml de suero fisiológico ascendió a 46.5 ± 28.7 ml. Las células nucleadas obtenidas fueron $0.19 \pm 0.14 \times 10^9$, lo que supone un 18% de las células obtenidas en la primera fracción y un 15% del total de células de la unidad. La distribución de unidades de SCU según el contenido de células nucleadas en la segunda fracción respecto al obtenido en la unidad total se muestra en la

TABLA 21. Volumen y celularidad de las fracciones de SCU obtenidas por punción de la vena umbilical (Fracción 1ª) y tras perfusión de la placenta (Fracción 2ª)

	Fracción 1ª	Fracción 2ª	Unidad SCU	Frac.2ª/Unidad SCU (%)
Volumen (ml)	87.3 ± 35.2	46.5 ± 28.7	135 ± 50.1	33.7 ± 15.7
Células nucleadas ($\times 10^9$)	1.07 ± 0.45	0.19 ± 0.14	1.26 ± 0.52	15.5 ± 9.8

Los resultados (media \pm ds, n=44) muestran el volumen y células nucleadas en cada una de las dos fracciones de recogida y en la unidad completa de SCU. La columna de la derecha muestra la proporción (porcentaje medio \pm ds) que aporta la fracción 2ª en volumen y celularidad al contenido total de la unidad de SCU.

figura 8. Aproximadamente en una de cada cuatro unidades, la fracción segunda representó más del 20% de la celularidad total, mientras que en una de cada tres unidades la rentabilidad de esta segunda fracción fue mínima (<10% de las células nucleadas finales). En un porcentaje pequeño, aunque significativo (9% de las unidades de SCU), la fracción segunda supuso más del 30% de las células finalmente obtenidas (Tabla 22 y Figura 8).

Sumando las dos fracciones, el 41% de las unidades contuvieron un número igual o superior a 1.3×10^9 células, frente al 30% de unidades si únicamente se hubiera realizado la recogida por venopunción. Es decir, gracias a la segunda fracción obtenida tras perfusión de la

TABLA 22. Frecuencia de unidades de SCU de acuerdo con la proporción de volumen y celularidad que aporta la Fracción 2ª

	Fracción 2ª / Unidad SCU			
	> 50%	> 30%	> 20%	< 10%
Volumen	14	64	80	9
Células nucleadas	2	9	27	34

Los resultados (n=44) muestran el porcentaje de unidades en las que la Fracción 2ª representa la proporción indicada en volumen y celularidad respecto a los valores globales de la unidad de SCU.

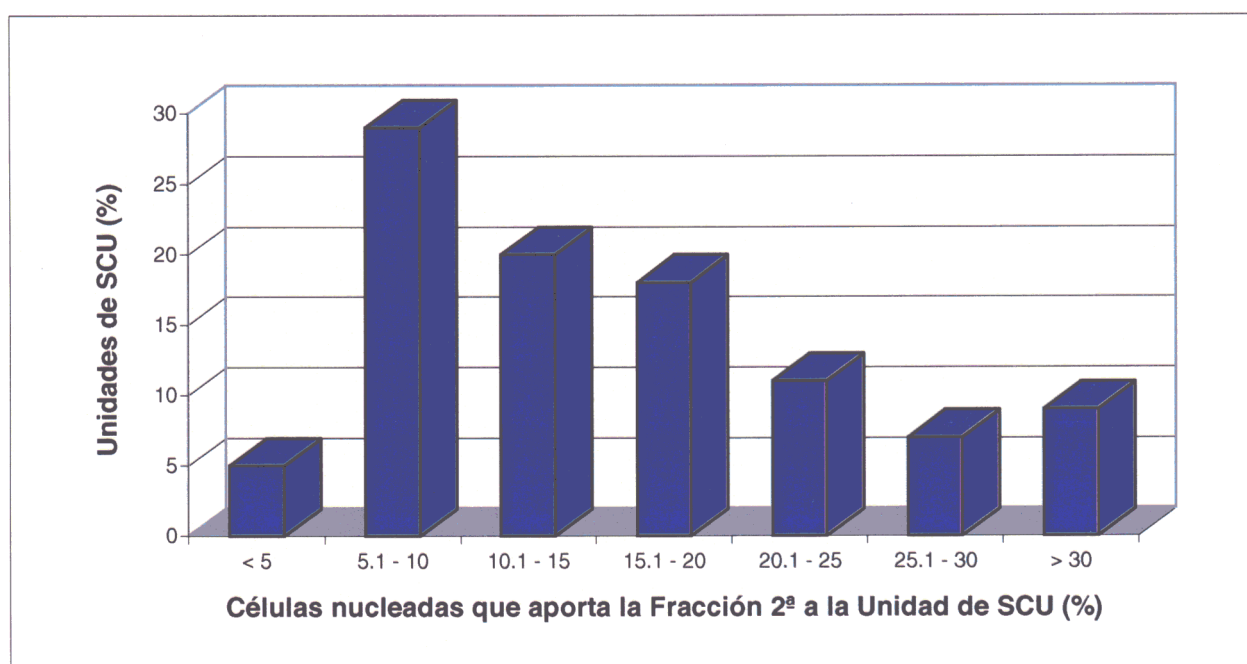


FIGURA 8. Frecuencia de unidades de SCU según la celularidad de la Fracción 2ª. Los datos en abscisas muestran el porcentaje de células nucleadas que aporta la Fracción 2ª al contenido total de células nucleadas de la unidad de SCU (n=44).

placenta, un 11% más de unidades de SCU proporcionarían una dosis celular de al menos 2×10^7 /kg en pacientes adultos de hasta 65 kg de peso.

Considerando esta cifra de 2×10^7 células nucleadas/kg como la dosis umbral requerida para trasplante (Laporte y cols., 1998), un número significativo de unidades (22 de 44) no hubieran podido ser utilizadas en receptores con más de 50 kg de peso si únicamente se hubiera empleado el procedimiento habitual de recogida por venopunción (Tabla 23). Estas unidades tenían en la primera fracción un volumen inferior a 100 ml (n=30) y un número de células nucleadas menor de 1×10^9 (n=22). Sin embargo, un 73% y un 41% de unidades con una primera fracción escasa alcanzaron con la obtención adicional de sangre placentaria un volumen y una celularidad finales superiores a 100 ml y 1×10^9 células, respectivamente (Tabla 23).

TABLA 23. Frecuencia de unidades con <100 ml o $<1 \times 10^9$ células en la Fracción 1ª que alcanzan valores globales superiores de volumen y celularidad

	Fracción 1ª <100 ml Unidad SCU >100 ml	Fracción 1ª $<1 \times 10^9$ células Unidad SCU $>1 \times 10^9$ células
Unidades de SCU (%)	73	41

Los resultados muestran el porcentaje de unidades de SCU (n=44) en las que, siendo el volumen y la celularidad de la Fracción 1ª inferiores a 100 ml (n=30) o 1×10^9 células nucleadas (n=22), se superan estos valores con el contenido aportado por la Fracción 2ª.

En resumen, la recogida complementaria de SCU mediante perfusión arteriovenosa de la placenta, sumada a la sangre habitualmente obtenida por venopunción, es un procedimiento que permite enriquecer de forma significativa el número de células nucleadas en una proporción considerable de unidades de SCU (más del 20% de la celularidad total en el 27% de las unidades). Empleando únicamente el método de venopunción, la mitad de las unidades de SCU tendrían una celularidad escasa para asegurar el implante hematopoyético en pacientes adultos con más de 50 kg de peso; la fracción adicional de sangre placentaria permite alcanzar una celularidad final suficiente para proporcionar 2×10^7 células/kg en el 41% de estas unidades. En el caso de receptores de trasplante de más de 65 kg, solo un 30% de las unidades obtenidas mediante venopunción proporcionarían una celularidad suficiente, mientras que con la combinación de las dos fracciones de recogida, el 41% de las unidades alcanzan la dosis celular recomendada para trasplante en pacientes adultos.

3.2.- Efecto de distintas medidas de asepsia preventivas de contaminación bacteriana durante la recogida de SCU.

Como ya se ha mencionado, la incidencia de contaminación bacteriana en la muestra de estudio fue del 9.2%, siendo *Estafilococo epidermidis* y *Streptococo agalactiae* los gérmenes más frecuentes dentro del grupo aerobio, y la contaminación por *Bacteroides fragilis* la de mayor frecuencia en el grupo anaerobio.

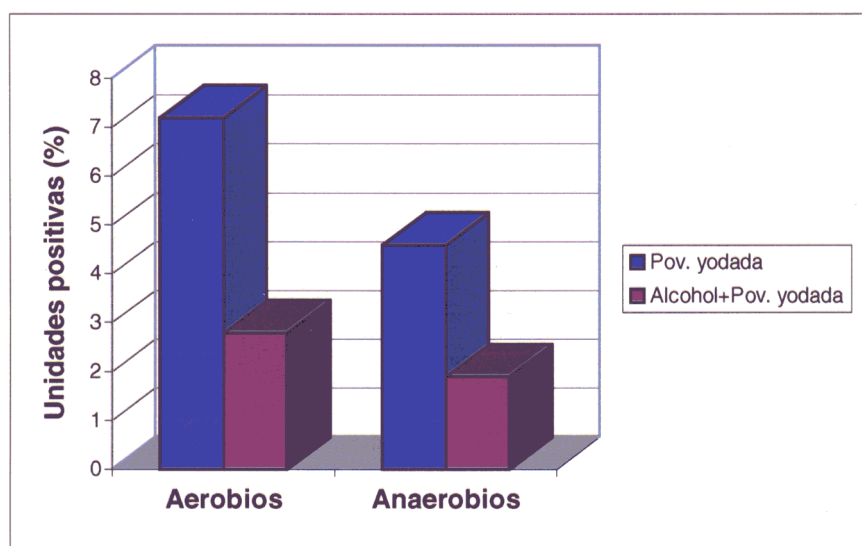


FIGURA 9. Contaminación bacteriana de SCU en función del procedimiento de esterilización de la zona de venopunción. Los resultados muestran el porcentaje de unidades de SCU positivas para gérmenes aerobios y anaerobios tras esterilización con povidona yodada (n=195) o con alcohol 70% seguida de povidona yodada (n=105). Las diferencias son significativas ($p<0.0001$, prueba de Chi-cuadrado).

En las primeras 195 unidades de SCU, la esterilización de la zona de punción se realizó mediante la aplicación de povidona yodada exclusivamente. La incidencia de contaminación bacteriana de un 11.8% se consideró excesivamente elevada, razón por la que se decidió aumentar el grado de asepsia en la obtención de las unidades subsiguientes. Así, las restantes 105 unidades se recogieron tras esterilización de la zona de punción con alcohol al 70% antes de la aplicación de povidona yodada, reduciéndose la incidencia de contaminación bacteriana a un 4.7%, tal como ilustra la figura 9. La tasa de contaminación fue menor tanto en el grupo de gérmenes aerobios como anaerobios, siendo la diferencia significativa en ambos grupos ($p<0.0001$, prueba de Chi-cuadrado).

3.3.- Repercusión del intervalo entre la obtención y el procesamiento de la SCU sobre la viabilidad celular.

Normalmente, una vez que la unidad de SCU se obtiene en el paritorio, transcurren varias horas hasta que es remitida al laboratorio y se inicia su procesamiento. Aún no están bien definidos el tiempo máximo permisible ni la temperatura óptima de conservación durante este intervalo. Diversos estudios han indicado como mejor temperatura de almacenamiento,

indistintamente 4° o 22°C (Broxmeyer y cols., 1989; Rubinstein y cols., 1993). La decisión adoptada en nuestro Banco de SCU fue la de utilizar la temperatura de conservación de 4°C para evitar exponer determinadas unidades a temperaturas superiores a 22°C, especialmente en épocas cálidas del año.

Debido a que en los estudios realizados hasta el momento no se han evaluado de forma sistemática los posibles efectos del tiempo transcurrido desde la obtención de SCU hasta su criopreservación, decidimos llevar a cabo un análisis que permitiera determinar con mayor precisión el intervalo de tiempo disponible entre la obtención y el procesamiento de la SCU sin que tenga lugar una pérdida celular significativa. Estudiamos la relación entre el tiempo de almacenamiento a 4°C, en primer lugar, con la viabilidad de células nucleadas medida por exclusión de azul tripán; en segundo lugar, con el número de células formadoras de colonias granulocito-macrofágicas (CFU-GM) y eritroides (BFU-E). Ambos análisis se realizaron en tres momentos distintos: i) al final del periodo de almacenamiento e inmediatamente antes de iniciar el procesamiento de las unidades; ii) después de añadir la solución crioprotectora (dimetilsulfóxido al 10% en medio 199); y iii) tras la descongelación.

TABLA 24. Repercusión del tiempo de conservación a 4°C sobre la viabilidad celular de SCU

Almacenamiento	T. conservación (horas)	Viabilidad (%)		
		V ₁	V ₂	V ₃
0 - 68 horas	15.6 ± 9.1 (n=287)	96.9 ± 5.0 (n=21)	83.9 ± 15.3 (n=317)	74.4 ± 11.9 (n=21)
≤ 12 horas	6.4 ± 4.2 (n=93)	98.5 ± 1.4 (n=6)	91.6 ± 5.9 (n=86)	80.9 ± 6.1 (n=8)
> 12 horas	20.0 ± 7.4 (n=194)	96.2 ± 5.8 (n=15)	81.7 ± 15.6 (n=191)	76.5 ± 9.3 (n=6)

Porcentaje de células nucleadas viables de SCU analizadas mediante exclusión de azul tripán al final del periodo de conservación (V₁), después de añadir la solución crioprotectora (V₂) y tras la descongelación (V₃). Los resultados (media ± ds) muestran la viabilidad celular en la muestra global de unidades de SCU (tiempo transcurrido entre la obtención y el procesamiento: 0-68 horas), así como en las unidades procesadas antes o después de 12 horas.

3.3.1.- Células nucleadas.

El tiempo medio de conservación (T_c) de las unidades de SCU antes de su procesamiento fue 15.6 ± 9.1 horas. Como puede observarse en la tabla 24, analizando el conjunto de las unidades almacenadas entre 0 y 68 horas, la viabilidad celular sufrió un descenso de un 13% cuando se añadió la solución crioprotectora (V_2) respecto a los valores obtenidos antes de iniciar el procesamiento (V_1). Tras la descongelación (V_3), se observó una disminución adicional en torno a un 10%. Esta reducción en la viabilidad celular fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$, prueba t pareada), y refleja el efecto citotóxico secuencial inducido por el agente crioprotector y por el proceso de congelación/descongelación.

Para conocer si este daño celular crioinducido pudiera acentuarse en función del intervalo transcurrido desde la obtención de la SCU hasta su procesamiento, relacionamos el T_c de las unidades con la viabilidad celular en cada uno de los tres momentos descritos. De los tres valores de viabilidad, solo V_2 (viabilidad tras añadir el crioprotector) demostró tener una clara dependencia con respecto al T_c (Figura 10, coeficiente de correlación de Pearson $r = -0.461$), asistiéndose a una reducción significativa a medida que aumenta el intervalo entre obtención y procesamiento. La influencia del T_c sobre V_1 (viabilidad de la SCU antes del procesamiento) no

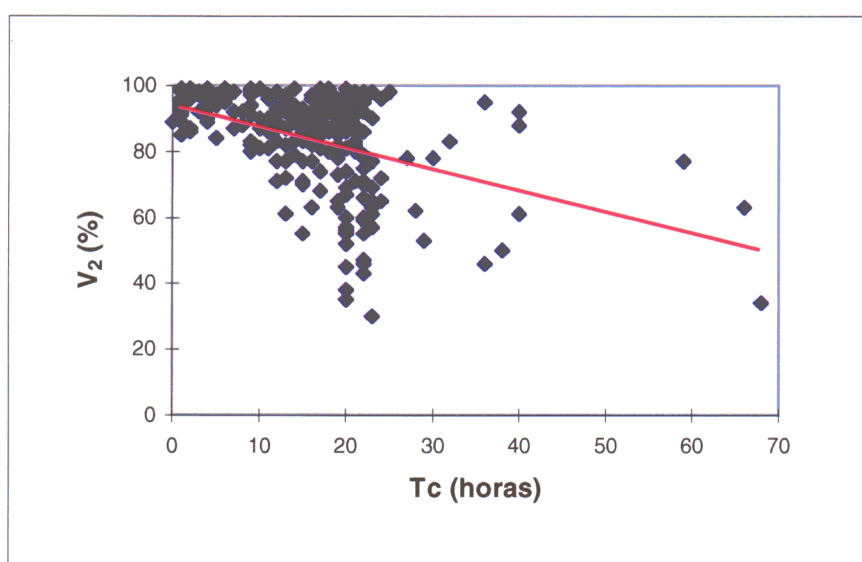


FIGURA 10. Correlación entre el tiempo de conservación (T_c) a 4°C y la viabilidad celular de SCU tras añadir la solución crioprotectora (V_2). Coeficiente de correlación de Pearson, $r = -0.461$, ($n = 277$).

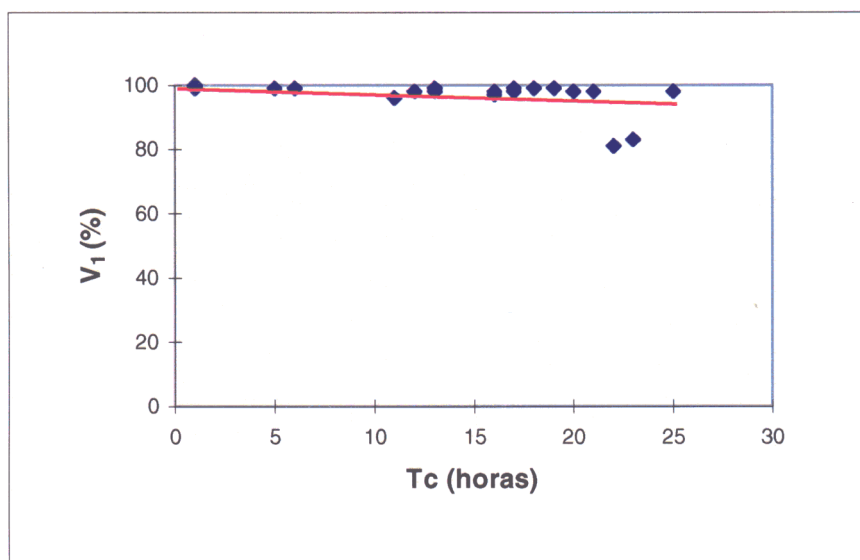


FIGURA 11. Correlación entre el tiempo de conservación (T_c) a 4°C y la viabilidad celular de SCU al final del periodo de almacenamiento (V_1). Coeficiente de correlación de Pearson, $r=-0.435$ ($n=21$).

fue tan marcada (Figura 11, $r=-0.435$), y no se manifestó relación alguna entre T_c y V_3 (viabilidad tras la descongelación).

Por comparación de las unidades procesadas en las primeras 12 horas desde la obtención ($n=93$) frente a las procesadas posteriormente ($n=194$), se observó que el valor de V_2 es significativamente superior en el primer grupo: $91.6 \pm 5.9\%$ vs $81.7 \pm 15.6\%$ ($p < 0.001$, prueba t no pareada) (Tabla 24 y Figura 12). Las diferencias observadas en los valores de V_1 y V_3 , cuando se compararon ambos grupos de unidades, fueron más reducidas y estadísticamente no significativas.

Hay que destacar el hecho de que en nueve de las unidades de SCU procesadas después de 12 horas desde la recogida (4.6%) se formaron agregados celulares cuando se añadió la solución crioprotectora; la viabilidad celular (V_2) en estas nueve unidades fue particularmente reducida: $47.2 \pm 19.0\%$. Este fenómeno, ocasionado muy probablemente por degradación celular y liberación de nucleoproteínas y enzimas lisosomales como resultado de la lisis de una elevada proporción de granulocitos al añadir el agente crioprotector, representa el grado extremo de lesión celular en relación con un T_c prolongado. En las unidades almacenadas durante un tiempo

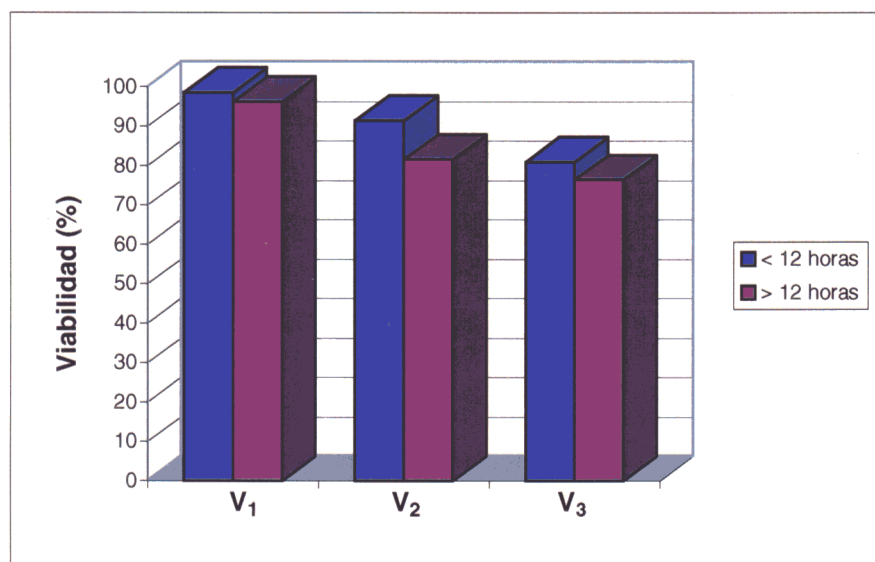


FIGURA 12. Influencia del tiempo de conservación sobre la viabilidad celular de SCU. Los datos muestran la viabilidad (exclusión de azul tripán) en unidades procesadas antes ($n=93$) o después ($n=194$) de 12 horas desde la recogida de SCU. Los valores al final del periodo de almacenamiento (V_1) y tras la descongelación (V_3) son similares en ambos grupos, mientras que es significativa la diferencia en la viabilidad tras añadir la solución crioprotectora (V_2) ($p<0.001$, prueba t no pareada).

inferior a 12 horas, nunca se evidenció formación de macroagregados coincidiendo con la adición de la solución de congelación.

3.3.2.- Células progenitoras hematopoyéticas.

El análisis de la viabilidad global de una población celular compleja no permite discernir qué células resultan más afectadas por una determinada agresión. La disminución en la viabilidad de SCU durante el almacenamiento puede indicar una lesión exclusiva de células maduras (principalmente granulocitos), pero es posible que una proporción de células progenitoras hematopoyéticas haya sido también dañada. Para comprobar esta posibilidad y evaluar de manera cuantitativa la pérdida de células progenitoras en el intervalo previo al procesamiento, se relacionó el Tc de las unidades de SCU con el número de progenitores granulocito-macrofágicos y eritroides, determinados mediante ensayos clonogénicos.

El número de células formadoras de *burst* eritroides (BFU-E) y de colonias granulocito-macrofágicas (CFU-GM) generadas en cultivo de 14 días a partir de 50.000 células de SCU se muestran respectivamente en las tablas 25 y 26, indicándose las tres fases descritas en las que se realizó el análisis. En el conjunto de las unidades almacenadas entre 0 y 68 horas, análogamente

TABLA 25. Repercusión del tiempo de conservación a 4°C sobre progenitores eritroides de SCU

Almacenamiento	BFU-E		
	E ₁	E ₂	E ₃
0 - 68 horas	25.4 ± 14.2 (n=131)	23.9 ± 15.5 (n=134)	14.1 ± 11.9 (n=21)
≤ 12 horas	25.4 ± 13.1 (n=45)	27.7 ± 16.4 (n=46)	15.2 ± 14.7 (n=8)
> 12 horas	25.8 ± 15.0 (n=79)	22.1 ± 14.8 (n=81)	14.5 ± 7.0 (n=6)

Eficiencia clonogénica (numero de colonias en 5×10^4 células sembradas en el cultivo) de progenitores eritroides al final del periodo de conservación (E₁), después de añadir la solución crioprotectora (E₂) y tras la descongelación (E₃). Los resultados muestran la eficiencia clonogénica (media ± ds) en la muestra global de unidades de SCU (tiempo transcurrido entre la obtención y el procesamiento: 0 - 68 horas), así como en las unidades procesadas antes o después de 12 horas.

Abreviaturas: BFU-E, células formadoras de *bursts* eritroides.

TABLA 26. Repercusión del tiempo de conservación a 4°C sobre progenitores granulocito-macrofágicos de SCU

Almacenamiento	CFU-GM		
	GM ₁	GM ₂	GM ₃
0 - 68 horas	21.6 ± 14.6 (n=131)	19.7 ± 14.5 (n=138)	12.0 ± 8.3 (n=21)
≤ 12 horas	23.5 ± 16.2 (n=45)	21.2 ± 15.2 (n=48)	15.0 ± 10.4 (n=8)
> 12 horas	20.6 ± 13.8 (n=79)	19.4 ± 14.5 (n=83)	10.2 ± 6.3 (n=6)

Eficiencia clonogénica (numero de colonias en 5×10^4 células sembradas en el cultivo) de progenitores granulocito-macrofágicos al final del periodo de conservación (GM₁), después de añadir la solución crioprotectora (GM₂) y tras la descongelación (GM₃). Los resultados muestran la eficiencia clonogénica (media ± ds) en la muestra global de unidades de SCU (tiempo transcurrido entre la obtención y el procesamiento: 0 - 68 horas), así como en las unidades procesadas antes o después de 12 horas.

Abreviaturas: CFU-GM, células formadoras de colonias granulocito-macrofágicas.

a los resultados de viabilidad descritos en el punto anterior, se constató un descenso progresivo en el número de células progenitoras al añadir la solución crioprotectora (E_2 y GM_2) y tras la congelación/descongelación (E_3 y GM_3), comparados con los valores obtenidos antes del procesamiento (E_1 y GM_1), si bien en este caso las diferencias no fueron significativas. Esta reducción viene a corroborar el efecto citotóxico relacionado con la criopreservación, como se había visto en el análisis de viabilidad celular.

Cuando se estudió la influencia del intervalo transcurrido desde la obtención hasta el procesamiento, solamente fue apreciable una discreta correlación inversa entre el T_c y los valores E_2 (BFU-E al añadir el crioprotector) (Figura 13, $r=-0.25$). Asimismo, cuando se compararon las unidades de SCU procesadas antes y después de las primeras 12 horas de almacenamiento, el promedio de E_2 fue significativamente superior en el primer grupo: 27.7 ± 16.4 vs 22.1 ± 14.8 (Tabla 25 y Figura 14, $p=0.05$, prueba t no pareada). La influencia del T_c sobre progenitores granulocito-macrofágicos fue menos marcada, siendo las diferencias en los valores de CFU-GM antes y después de 12 horas de almacenamiento no significativas (Tabla 26 y Figura 15). Por tanto, aunque estadísticamente demostrable solo en el linaje eritroide, este estudio revela también una repercusión negativa del tiempo de almacenamiento sobre células

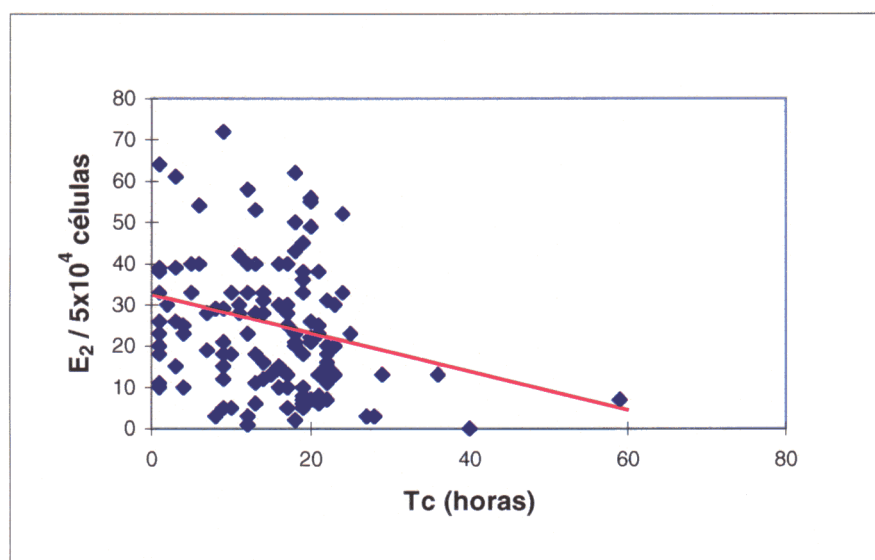


FIGURA 13. Correlación entre el tiempo de conservación (T_c) a 4°C y el número de progenitores eritroides (BFU-E) tras añadir la solución de criopreservación (E_2). Coeficiente de correlación de Pearson, $r=-0.25$ ($n=127$).

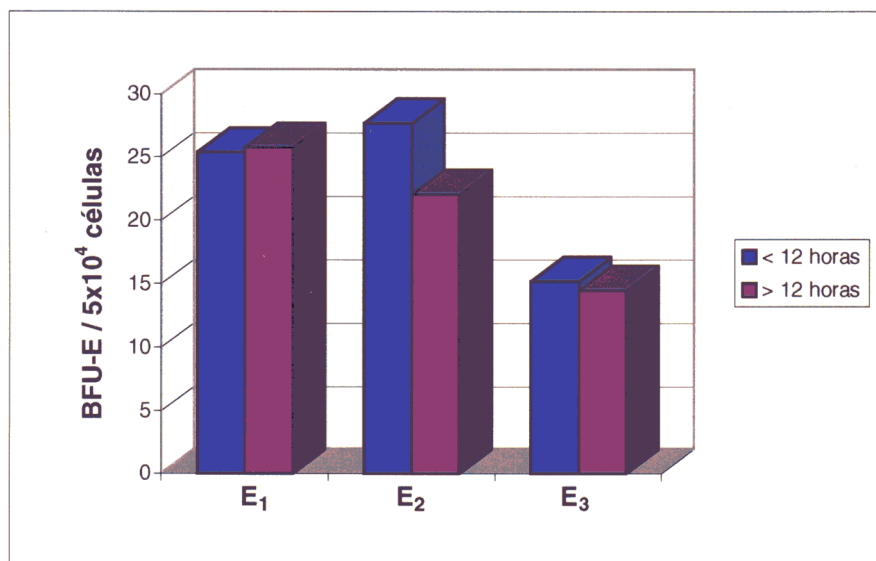


FIGURA 14. Influencia del tiempo de conservación sobre el número de BFU-E de SCU. Los datos muestran la eficiencia clonogénica de BFU-E en las unidades procesadas antes (n=46) o después (n=81) de 12 horas desde la recogida de la SCU. Los valores al final del periodo de almacenamiento (E₁) y tras la descongelación (E₃) son similares en ambos grupos, mientras que es significativa la diferencia tras añadir la solución crioprotectora (E₂) (p=0.05, prueba *t* no pareada).

progenitoras hematopoyéticas, daño que se evidencia principalmente con la exposición de la SCU al agente crioprotector dimetilsulfóxido.

En conjunto, estos datos permiten concluir que las células de SCU sufren un deterioro progresivo durante el periodo que transcurre desde su obtención hasta el procesamiento. El

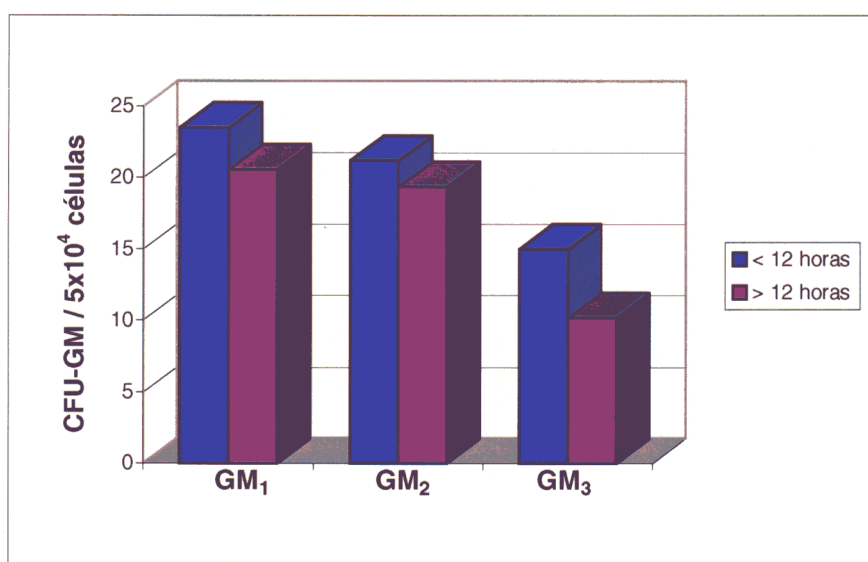


FIGURA 15. Influencia del tiempo de conservación sobre el número de CFU-GM de SCU. Los datos muestran la eficiencia clonogénica de CFU-GM en las unidades procesadas antes (n=48) o después (n=83) de 12 horas desde la recogida de la SCU. No hay diferencias significativas en los valores al final del periodo de almacenamiento (GM₁), tras añadir la solución crioprotectora (GM₂) y tras la descongelación (GM₃).

intervalo de conservación máximo permisible es aproximadamente 12 horas, por encima del cual existe una disminución importante de la viabilidad celular. En algunos casos, el daño es lo suficientemente intenso como para que se formen agregados macroscópicos con atrapamiento irreversible de una parte o el resto de las células viables de la unidad. Este deterioro afecta no solo a células diferenciadas (según puede deducirse del análisis mediante exclusión de azul tripán), sino también a células progenitoras hematopoyéticas (ensayos clonogénicos).

El estudio revela, además, que el daño celular sufrido durante el periodo de almacenamiento debe ser comprobado una vez añadida la solución crioprotectora, ya que es en esta fase del procesamiento cuando se evidencia claramente el efecto lesivo sobre las unidades de SCU. Los valores de viabilidad al final del periodo de conservación (antes de iniciar el procesamiento) o tras la descongelación reflejan de manera insuficiente la magnitud de la pérdida celular que haya podido ocasionarse durante dicho intervalo.

3.4.- Factores predictivos de volumen y celularidad de las unidades de SCU.

Como ya se ha indicado previamente, la dosis celular en los trasplantes de SCU es uno de los factores más determinantes tanto de la probabilidad de implante como de la velocidad de reconstitución hematopoyética. Asimismo, el contenido de células progenitoras debería también predecir la tasa y rapidez del implante hematopoyético, aunque probablemente debido a la insuficiente estandarización de los métodos de cuantificación de células progenitoras, solo en algunas series de trasplante se ha podido demostrar la existencia de alguna correlación entre la dosis de progenitores infundida y la reconstitución hematológica.

Puesto que la riqueza celular de la SCU es muy variable, una proporción significativa de unidades HLA compatibles son en última instancia descartadas para efectuar un trasplante al no proporcionar la dosis celular mínima requerida, especialmente cuando se trata de receptores adultos o niños de mucho peso. Por esta razón, sería importante disponer de factores que permitan predecir antes y/o durante el parto la celularidad de las unidades de SCU. Así, podrían restringirse las recolecciones de SCU a aquellas que fueran consideradas adecuadas en base a esta predicción perinatal del contenido celular. De este modo, la limitación impuesta por el peso

del receptor afectaría a un menor número de las unidades almacenadas, en contraposición a si todas las donaciones de SCU fuesen obtenidas y procesadas de forma indiscriminada.

Con este fin, se llevó a cabo un análisis de regresión múltiple en el que se contemplaron una serie de características maternas y fetales potencialmente relevantes, para intentar predecir la celularidad de las unidades de SCU.

3.4.1.- Variables dependientes.

Además de la celularidad total, se seleccionaron como variables dependientes del análisis de regresión otros parámetros que también pueden ser indicadores de la idoneidad de las unidades de SCU. De esta forma, al contemplar una serie de variables dependientes, se amplían las posibilidades de encontrar la mejor ecuación de regresión entre todas las calculadas a partir de los mismos factores predictores.

Cada una de las variables dependientes con las que se han construido los modelos de regresión que más adelante se describen, fueron las siguientes:

- a) Volumen (**VOL**): volumen efectivo de SCU (volumen total de la unidad menos volumen de anticoagulante (ml)
- b) Concentración celular (**CC**): recuento de células nucleadas ($\times 10^9/L$)
- c) Células nucleadas totales (**CT**): número absoluto de células nucleadas ($\times 10^9$)
- d) Porcentaje de células $CD34^+$ (**PCD34**): frecuencia de células $CD34^+$ (%)
- e) Células $CD34^+$ totales (**ACD34**): número absoluto de células $CD34^+$ ($\times 10^6$)
- f) Concentración de CFU-GM (**CGM**): eficiencia clonogénica de colonias granulocito-macrofágicas (número de colonias en 5×10^4 células sembradas en el cultivo)
- g) CFU-GM totales (**AGM**): número absoluto de CFU-GM ($\times 10^4$)
- h) Concentración de BFU-E (**CE**): eficiencia clonogénica de *burst* eritroides (número de colonias en 5×10^4 células sembradas en el cultivo)
- i) BFU-E totales (**AE**): número absoluto de BFU-E ($\times 10^4$)

TABLA 27. Variables dependientes utilizadas en los modelos de regresión

	media \pm ds	mediana	extremos
VOL (ml)	131.68 \pm 46.77	131	38 - 290
CC ($\times 10^9$ /l)	9.55 \pm 3.68	8.88	2.76 - 31.35
CT ($\times 10^9$)	1.22 \pm 0.51	1.16	0.34 - 3.43
PCD34 (%)	0.39 \pm 0.26	0.31	0.06 - 1.41
ACD34 ($\times 10^6$)	4.66 \pm 4.28	3.43	0.53 - 26.46
CGM ($n/5 \times 10^4$)	17.58 \pm 11.6	15.95	0 - 75
AGM ($\times 10^5$)	4.39 \pm 3.72	3.33	0 - 24.27
CE ($n/5 \times 10^4$)	25.33 \pm 16	22.55	0 - 104
AE ($\times 10^5$)	6.26 \pm 5.22	4.66	0 - 32.24

Los datos de cada una de las variables mostradas en la tabla se han obtenido a partir del análisis de 300 unidades de SCU, excepto en PCD34 y ACD34 donde se han analizado 183 unidades.

Abreviaturas: ds, desviación estándar; VOL, volumen efectivo de SCU (volumen total menos volumen de anticoagulante); CC, concentración de células nucleadas; CT, número absoluto de células nucleadas; PCD34, porcentaje de células CD34 positivas; ACD34, número absoluto de células CD34 positivas; CGM, concentración de CFU-GM (número de colonias granulocito-macrofágicas en 5×10^4 células sembradas); AGM, número absoluto de CFU-GM; CE, concentración de BFU-E (número de *bursts* eritroides en 5×10^4 células sembradas); AE, número absoluto de BFU-E.

El valor medio, la desviación estándar, la mediana y el rango de cada una de las variables dependientes se muestran en la Tabla 27.

3.4.2.- Variables predictoras.

Las potenciales variables predictoras (independientes) analizadas en cada uno de los modelos de regresión fueron:

- a) Sexo (**SEX**): sexo del recién nacido (M / F)
- b) Peso (**PESO**): peso del recién nacido (g)
- c) Test de Apgar (**APG**): test de Apgar al minuto del nacimiento (0-10)

- d) Edad (**EDAD**): edad de la madre (años)
- e) Número de gestación (**GEST**): número total de gestaciones incluida la de la donación de SCU (n)
- f) Consumo de tabaco (**TABC**): madre fumadora (Sí / No)
- g) Ingesta de alcohol (**ETOH**): ingesta superior a 30 g/día de alcohol (Sí / No)

El valor medio, la desviación estándar, la mediana y el rango de las variables predictoras cuantitativas PESO, APG, EDAD Y GEST se muestran en la Tabla 28. La distribución de frecuencias de las variables predictoras categóricas SEX, TABC y ETOH fueron las siguientes (%):

SEX (n=275): 53.5 (M) / 46.5 (F)
 TABC (n=287): 65.5 (No) / 34.5 (Sí)
 ETOH (n=287): 98.6 (No) / 1.4 (Sí)

3.4.3.- Modelos de regresión múltiple.

Para cada variable dependiente se construyó un modelo de regresión múltiple con el objetivo de identificar entre las potenciales variables predictoras el subconjunto que permitiera explicar una parte de la variación de la variable dependiente (ver tabla 27).

TABLA 28. Variables predictoras cuantitativas analizadas en los modelos de regresión

	PESO (g)	APG (0-10)	EDAD (años)	GEST (n)
media \pm ds	3241.9 \pm 402.5		29.7 \pm 4.8	
mediana	3260	9	30	2
extremos	1850 - 4270	3 - 10	16 - 42	1 - 5

Los datos de las variables PESO y APG se han obtenido a partir del análisis de 275 unidades de SCU, y los de EDAD y GEST a partir de 323 y 290 unidades, respectivamente.

Abreviaturas: ds, desviación estándar; PESO, peso del recién nacido; APG, test de Apgar al minuto del nacimiento; EDAD, edad de la madre; GEST, número de gestaciones (incluida la de la donación de SCU).

Antes de la elaboración de los modelos se comprobó la ausencia de colinealidad entre las variables independientes (considerándose que existe colinealidad cuando se demuestra correlación entre dos variables con un coeficiente >0.9), de forma que la estimación de los coeficientes de regresión de cada ecuación pudiera considerarse estable. Por ejemplo, el coeficiente de correlación encontrado entre las variables EDAD y GEST, $r=0.32$, fue el más elevado, siendo inferior en el resto de combinaciones de variables analizadas.

El proceso de selección de la mejor ecuación de regresión empleado en la construcción de cada modelo consistió en las siguientes fases: i) la selección por pasos de las variables predictoras, tanto en un sentido anterógrado (incorporando en la ecuación las variables una a una) como retrógrado (incorporando todas las variables y retirándolas sucesivamente), atendiendo a si el valor P de la prueba de significación con cada variable incorporada o retirada de la ecuación satisfacía el criterio de inclusión ($P<0.05$) o de exclusión ($P>0.10$); ii) una vez incorporadas o retiradas solo aquellas variables que cumplieran con los criterios de inclusión o exclusión prefijados, el estudio de la significación de cada modelo se realizó mediante el análisis de la variancia de la regresión (cociente F de medias cuadráticas), que permitió comprobar si la parte de variación explicada por la ecuación de regresión era estadísticamente significativa. La proporción de la variación total que es explicada por la regresión se obtuvo calculando el coeficiente de determinación ajustado (R^2_a), el cual es una medida del poder de predicción de la ecuación de regresión; iii) después de obtener la ecuación que mejor satisfacía el criterio de selección, ésta fue finalmente aceptada si el error estándar de los coeficientes de regresión no era muy alto ($<40\%$), de manera que el intervalo de confianza de dichos coeficientes fuese suficientemente reducido.

Aplicando el procedimiento descrito, solamente las ecuaciones de regresión calculadas para las variables dependientes VOL (volumen de SCU), CT (células nucleadas totales), ACD34 (células CD34⁺ totales), AGM (CFU-GM totales) y AE (BFU-E totales) cumplían los criterios mencionados, mientras que los modelos contruidos para las variables referidas a la concentración de células nucleadas o de progenitores hematopoyéticos (CC, PCD34, CGM y CE) no resultaron significativos, o el error estándar de los coeficientes de regresión fue excesivamente alto. En la tabla 29 se muestran las ecuaciones de regresión estimadas para las

variables VOL, CT, ACD34, AGM y AE. Las variables predictoras que contribuyeron de forma estadísticamente significativa a explicar una parte de la variación de estas variables dependientes fueron PESO (peso del recién nacido) y GEST (número de gestaciones), salvo en el modelo de la variable dependiente CT en el que solo la variable independiente PESO alcanzó significación estadística. Es decir, a partir del peso del recién nacido y del número de gestaciones previas es posible predecir el volumen, las células nucleadas y el contenido de progenitores de las unidades de SCU, si bien la variación residual (no explicada por la regresión) fue alta en todos los casos, según indican los valores reducidos de los coeficientes R^2_a : las ecuaciones de regresión estimadas solo explicaron entre el 9 y el 18% de la variabilidad de las variables dependientes.

Hay que resaltar el hecho de que ninguna de las variables independientes que analizamos demostró tener poder predictivo sobre los valores de concentración de células nucleadas ni de progenitores hematopoyéticos (células CD34⁺, CFU-GM o BFU-E). Por tanto, el resultado de la

TABLA 29. Modelos de regresión estadísticamente significativos, intervalos de confianza del 95% de los coeficientes de regresión, y coeficiente de determinación ajustado (R^2_a)

Variable dependiente	Ecuación de Regresión	IC 95%	R^2_a
VOL (ml)	$VOL = 40.31 \times PESO + 10.77 \times GEST - 19.37$	Peso: 25.65 - 54.97 Gest: 3.74 - 17.79	0.13
CT ($\times 10^9$)	$CT = 0.56 \times PESO - 0.6$	Peso: 0.41 - 0.72	0.18
ACD34 ($\times 10^6$)	$ACD34 = 2.72 \times PESO + 1.7 \times GEST - 6.93$	Peso: 0.64 - 4.80 Gest: 0.57 - 2.83	0.09
AGM ($\times 10^4$)	$AGM = 23.65 \times PESO + 8.41 \times GEST - 48.23$	Peso: 12.21 - 35.09 Gest: 2.89 - 13.92	0.09
AE ($\times 10^4$)	$AE = 40.13 \times PESO + 14.32 \times GEST - 94.44$	Peso: 24.41 - 55.86 Gest: 6.66 - 21.77	0.13

Abreviaturas: VOL, volumen efectivo de SCU (volumen total menos volumen de anticoagulante); CT, número absoluto de células nucleadas; ACD34, número absoluto de células CD34 positivas; AGM, número absoluto de CFU-GM; AE, número absoluto de BFU-E; PESO, peso del recién nacido (kg); GEST, número de gestaciones.

regresión múltiple que se ha descrito, al explicar una parte de la variabilidad de los valores absolutos, pero no de la concentración celular en SCU, obliga necesariamente a pensar que los factores con valor predictivo (PESO y GEST) identificados en los cinco análisis de regresión significativos solo predicen de forma independiente el volumen de SCU, y que los valores absolutos de celularidad y progenitores hematopoyéticos están secundariamente determinados por el volumen de la unidad. La existencia de una correlación lineal entre el volumen de SCU y el número absoluto de células nucleadas ($r=0.62$), células CD34⁺ ($r=0.38$), CFU-GM ($r=0.41$), y BFU-E ($r=0.43$) corrobora en parte esta dependencia. En definitiva, el modelo de regresión múltiple aplicado al volumen de SCU es el que emerge de entre los demás modelos como el único que define de forma independiente una relación significativa entre las variables predictoras PESO y GEST y la riqueza celular de las unidades de SCU.

El modelo de regresión correspondiente a las células nucleadas totales (CT) fue el que demostró poseer el poder de predicción más elevado ($R^2_a=0.18$) y, por ello, el que mejor se aproximaba a los valores observados. Aunque existía aún un 82% de variación residual, la ecuación de regresión del número de células nucleadas totales fue la que consiguió definir con mayor grado de precisión la riqueza celular de las unidades de SCU. Esta predicción se realiza exclusivamente a partir del peso del recién nacido (Tabla 29) sin que intervengan otras variables. Por estas razones, consideramos que este modelo es el más simple y útil para predecir la celularidad de las unidades de SCU y, con ello, estimar la probabilidad de que sean trasplantadas en el futuro.

3.5.- Separación celular y reducción de volumen. Recuperación obtenida con los diferentes métodos de fraccionamiento.

Para que un Banco de SCU pueda adquirir una buena operatividad, primero debe procesar y almacenar un número suficiente de unidades, de forma que ante una solicitud de búsqueda para un eventual trasplante exista una probabilidad elevada de encontrar al menos una unidad HLA compatible. Aunque no se conoce aún con precisión cual debería ser el número idóneo de unidades de SCU inventariadas, el tamaño recomendado provisionalmente por la Comisión Nacional de Trasplante de Médula Ósea para los bancos de SCU en España es de

3.000 unidades. Esta estimación está sujeta a revisiones futuras, derivadas esencialmente de la evolución que muestren los programas de trasplante de SCU en cuanto a la probabilidad de localización de donantes compatibles, así como de la información generada a partir de estudios poblacionales de suficiente entidad, a nivel nacional e internacional, sobre la distribución de frecuencias alélicas del sistema HLA.

Una de las dificultades más importantes que encierra este requisito de operatividad tiene una naturaleza meramente logística: el enorme espacio para el almacenamiento en nitrógeno líquido de un número considerablemente elevado de unidades, especialmente si no se realiza antes de la criopreservación ningún procedimiento de reducción de volumen. Dado que las unidades de SCU tienen un volumen medio aproximado de 130 ml (extremos: 38-290 ml; ver apartado 3.1.1.), al cual habría que sumar el volumen de la solución de congelación, es relativamente frecuente que en la criopreservación de una unidad de SCU no fraccionada haya que emplear más de una bolsa de 160 ml. Los depósitos de nitrógeno líquido disponibles actualmente en el mercado tienen una capacidad aproximada para 300 a 500 bolsas de 160 ml (según los modelos), lo cual significa que se necesitarían de 6 a 10 contenedores para satisfacer los requerimientos numéricos indicados.

El fraccionamiento de la sangre de cordón es, por tanto, uno de los retos permanentes e ineludibles de los bancos de SCU. Los procedimientos empleados para separar las células nucleadas y/o células progenitoras hematopoyéticas del resto de componentes sanguíneos han sido diversos, siendo también diferente la eficacia demostrada con cada uno de ellos. La finalidad última que se persigue con el fraccionamiento es reducir al máximo el volumen de las unidades de SCU, sin que ello se acompañe de una pérdida celular significativa. No siempre los resultados conseguidos con un determinado método son reproducibles en otros laboratorios, por lo que es imperativo que cada Banco de SCU compruebe y seleccione el método de separación con el que obtenga los mejores índices de recuperación celular.

Por todas estas razones, el estudio comparativo de los diferentes métodos de fraccionamiento fue uno de los aspectos abordados más precozmente en la estandarización de nuestro Banco de SCU. Los primeros ensayos consistieron en el empleo de gradientes de densidad, utilizados habitualmente para la separación de células mononucleadas de médula ósea y sangre periférica. En una segunda fase, analizamos otros métodos basados en el uso de agentes de sedimentación (metilcelulosa, gelatina e hidroxietil almidón). En este apartado se exponen los resultados obtenidos con estos procedimientos de separación celular en SCU.

3.5.1.- Gradientes de densidad.

El método estándar de separación con ficoll (densidad 1.077 g/ml) consiste en aislar solamente la interfase de células mononucleadas que se forma tras centrifugar la muestra sobre un volumen determinado de ficoll. Cuando se aplica esta metodología a muestras de sangre de cordón umbilical, la recuperación de progenitores hematopoyéticos es significativamente menor que la que se obtiene en médula ósea y sangre periférica, debido probablemente a la distinta densidad de las células de uno y otro origen.

Algunos autores han introducido modificaciones en la técnica con el propósito de aumentar la eficiencia de la separación de SCU con gradiente de ficoll. Concretamente, se ha sugerido que la obtención conjunta de las interfases correspondientes a plasma y células mononucleadas, más todo el ficoll restante hasta el botón de hematíes, mejora sustancialmente la recuperación celular (Harris y cols., 1994a); además, cuando se repite el procedimiento con las células obtenidas en la separación inicial, se consiguen fracciones de células mononucleadas altamente purificadas de granulocitos y eritrocitos. Alternativamente, también se ha recurrido al empleo de gradientes con una densidad superior a la del ficoll (Charbord y cols., 1992), basándose para ello en la mayor recuperación de células accesorias que estimularían la proliferación de progenitores hematopoyéticos mediante la producción de citocinas.

Nosotros estudiamos la eficacia de la separación con ficoll ($d=1.077$ g/ml) y con histopaque ($d=1.083$ g/ml), utilizando en ambos procedimientos las mismas condiciones en cuanto a dilución de la muestra, velocidad, temperatura y tiempo de centrifugación. Asimismo,

en los dos métodos fueron recogidas en su totalidad las tres fases superiores al sedimento de hematíes: plasma sobrenadante, células y gradiente residual (ver apartado 2.3.3.1. de Materiales y Métodos).

La tabla 30 muestra los resultados de estos experimentos. La recuperación celular obtenida con ficoll e histopaque fue respectivamente 19 y 25%. La separación de células nucleadas con el gradiente de densidad 1.083 g/ml fue superior, como era de esperar, a la conseguida con el gradiente de densidad 1.077 g/ml. La diferencia a favor del primero es atribuible a la retención de células con densidad intermedia entre ambos valores, principalmente granulocitos polinucleados. El grado de contaminación eritrocitaria y granulocítica fue superior al descrito, aunque este aspecto fue considerado menos relevante que la posible pérdida adicional de células que pudiera producirse durante un segundo fraccionamiento. Por lo tanto, no intentamos purificar aún más la fracción celular obtenida con una única separación.

La recuperación de células progenitoras clonogénicas (CFU-GM y BFU-E) también fue superior en la separación realizada con el gradiente de densidad 1.083 g/ml, aunque el análisis de células CD34⁺ mostró una mejor separación de estas células con el gradiente de densidad 1.077 g/ml (Tabla 30). En todo caso, la pérdida de células progenitoras fue elevada con ambos

TABLA 30. Recuperación de células nucleadas y progenitores hematopoyéticos de SCU tras separación con gradientes de densidad

	Ficoll (d=1.077 g/ml)	Histopaque (d=1.083 g/ml)
CN	19.1 ± 10.8	24.7 ± 12.9
CD34 ⁺	83.6 ± 38.4	64.8 ± 34.7
CFU-GM	40 ± 28.8	78.3 ± 51.1
BFU-E	35 ± 36.1	56.1 ± 36.7

Recuperación (porcentaje medio ± ds) de células nucleadas totales y células progenitoras hematopoyéticas de SCU tras separación con gradientes de densidad 1.077 g/ml (n=22) y 1.083 g/ml (n=34).

Abreviaturas: CN, células nucleadas; CD34⁺: células CD34 positivas; CFU-GM, células formadoras de colonias granulocito-macrofágicas; BFU-E, células formadoras de *bursts* eritroides.

gradientes de densidad, oscilando entre el 20 y el 65% dependiendo del análisis empleado para su determinación.

3.5.2.- Agentes de sedimentación.

Los resultados anteriores de una recuperación insuficiente de células progenitoras en SCU fraccionada con gradientes de densidad, nos indujo a considerar otros métodos de separación que demostraran mayor eficacia. La sedimentación de hematíes mediante aglutinación inducida por agentes como metilcelulosa, gelatina o hidroxietil almidón, es un procedimiento relativamente rápido y sencillo que permite deplecionar hematíes y separar las células nucleadas en muestras de médula ósea y sangre periférica. Para comprobar el comportamiento de estos agentes de sedimentación en SCU, ensayamos el fraccionamiento con cada uno de ellos siguiendo las técnicas previamente descritas excepto en la separación con hidroxietil almidón, en la que el paso de centrifugación contemplado en el método original fue sustituido por una sedimentación eritrocitaria por gravedad durante 90 minutos.

En la tabla 31 se resumen los datos de recuperación de células nucleadas y células progenitoras resultante del fraccionamiento de SCU con metilcelulosa 0.1%, gelatina 1.75% e

TABLA 31. Recuperación de células nucleadas y progenitores hematopoyéticos de SCU tras separación con agentes de sedimentación

	Metilcelulosa 0.1 %	Gelatina 1.75 %	Hidroxietil almidón 1.2 %
CN	80.7 ± 17.9	98.7 ± 38.5	92.3 ± 8.6
CD34 ⁺	86.7 ± 35.7		99.9 ± 30.5
CFU-GM	119.1 ± 63.8	104.9 ± 57.1	139.1 ± 69.8
BFU-E	92.7 ± 47.8	94.2 ± 50.1	100.4 ± 47.7

Recuperación (porcentaje medio ± ds) de células nucleadas totales y células progenitoras hematopoyéticas de SCU tras separación con metilcelulosa al 0.1% (n=27), gelatina al 1.75% (n=29) e hidroxietil almidón al 1.2% (n=80).

Abreviaturas: CN, células nucleadas; CD34⁺: células CD34 positivas; CFU-GM, células formadoras de colonias granulocito-macrofágicas; BFU-E, células formadoras de *bursts* eritroides.

hidroxietil almidón 1.2%. Hay que resaltar, de entrada, la diferencia importante que se observó respecto a la separación con gradientes de densidad, y es la recuperación celular superior al 80% en las tres modalidades de fraccionamiento con agentes de sedimentación. Estas diferencias se representan gráficamente en la figura 16, y fueron estadísticamente significativas ($p < 0.001$, U de Mann-Whitney), no solo la más evidente de ellas, es decir, la recuperación de células nucleadas, sino también las observadas en la recuperación de células $CD34^+$, CFU-GM y BFU-E.

La separación con metilcelulosa al 0.1% fue la que mostró en general menores índices de recuperación en comparación con el fraccionamiento mediante gelatina e hidroxietil almidón. Salvo en el caso de las CFU-GM, donde no se manifestó pérdida alguna, las restantes tasas de recuperación con metilcelulosa se cifraron entre el 80 y 90%. Sin embargo, la eficacia conseguida con gelatina al 1.75% así como con hidroxietil almidón al 1.2% se situaron siempre alrededor del 100% de recuperación. Por tanto, estos dos agentes han sido en nuestra experiencia

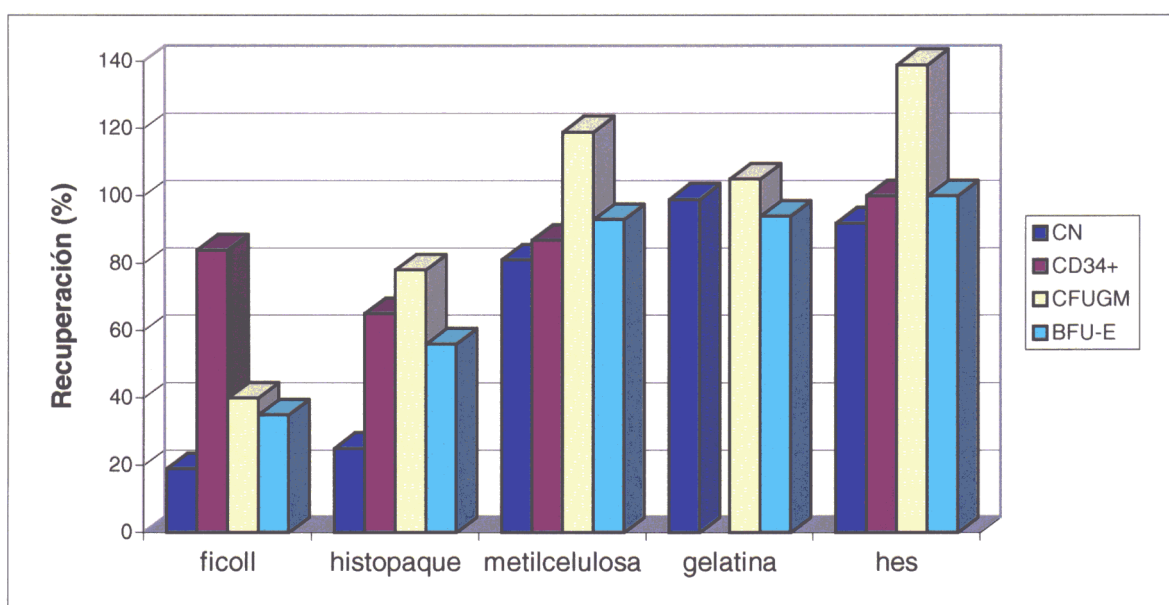


FIGURA 16. Separación de células nucleadas (CN) y progenitores hematopoyéticos (células $CD34^+$, CFU-GM y BFU-E) de SCU con ficoll ($d=1.077$ g/ml), histopaque ($d=1.083$ g/ml), metilcelulosa 0.1%, gelatina 1.75% y hidroxietil almidón (hes) 1.2 %. Las diferencias existentes entre la separación con ambos gradientes de densidad y la realizada con los tres agentes de sedimentación son significativas ($p < 0.001$, U de Mann-Whitney).

los que se asociaron con una pérdida inexistente o muy escasa de células totales y células progenitoras hematopoyéticas, demostrando ser los más idóneos para el fraccionamiento de SCU.

Durante el año 1996, coincidiendo con el desarrollo de este estudio, aparecieron en Inglaterra los primeros casos de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), que posteriormente se relacionaron con el consumo de alimentos de origen bovino presuntamente contaminados con el agente causante de esta entidad. La situación de alarma sociosanitaria surgida dió lugar a una serie de restricciones impuestas por la Comunidad Europea, no solo referentes al consumo alimenticio, sino también relativas a productos para uso cosmético y farmacológico que contienen sustancias de naturaleza bovina, entre las que se encuentra la gelatina. El producto empleado como fuente de gelatina en este estudio ha sido un expansor de volumen (Hemoce), utilizado frecuentemente en la clínica en casos de hemorragia aguda, shock hipovolémico o estados graves de hipotensión. En un primer momento, fue éste el agente seleccionado para procesar las primeras unidades de SCU del Banco, una vez demostrada su eficacia y considerando la seguridad clínica que hasta ese momento parecía tener. A partir del brote de ECJ, y disponiendo ya de los resultados óptimos del fraccionamiento de SCU con hidroxietil almidón, decidimos utilizar este agente en el procesamiento de las unidades subsiguientes. De esta forma, salvo las 30 primeras unidades que fueron fraccionadas con gelatina, el resto de las unidades depositadas hasta la actualidad en el Banco de SCU han sido fraccionadas con hidroxietil almidón antes de proceder a la criopreservación y almacenamiento posterior en nitrógeno líquido.

3.6.- Criopreservación.

Como ya se ha indicado previamente, son varias las ventajas del trasplante de SCU sobre los trasplantes de MO o SP, siendo una de ellas la rapidez en la identificación de unidades compatibles y la inmediata disponibilidad de las mismas. Esta posibilidad se deriva fundamentalmente de la existencia de unidades congeladas y almacenadas en Bancos de SCU, lo cual permite su utilización a demanda. En los últimos años, se han determinado las condiciones óptimas de criopreservación para MO y SP (Gorin y cols., 1986; Lamana y cols., 1990) y, por lo

general, éstas se han mostrado válidas para SCU (McCullough y cols., 1994; Rubinstein y cols., 1994; Donaldson y cols., 1996). Sin embargo, estos protocolos introducen un número de variables (por ejemplo, cinética de enfriamiento, volumen y formato de congelación, etc.), por lo que hemos considerado de interés para el establecimiento de nuestro Banco determinar de forma sistemática las condiciones óptimas de criopreservación de SCU.

La técnica de criopreservación que hemos empleado ha seguido las directrices básicas señaladas para la congelación de MO. Todas las unidades de SCU fueron mezcladas con un volumen igual de una solución de medio 199 con DMSO al 20 % (concentración final 10%), congeladas progresivamente hasta -120°C a una velocidad controlada de $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ antes y después de la fase de transición (cambio de fase líquida a fase sólida), y almacenadas a -196°C en nitrógeno líquido. Hemos preferido utilizar un equipo de congelación programada por considerar más segura la congelación controlada que la congelación mecánica en un refrigerador a -80°C , en la que no se puede neutralizar el calor de fusión generado durante el cambio de fase y además no es factible monitorizar la evolución del proceso. Mientras se llevaron a cabo los estudios de separación celular de SCU y se definía el mejor de los métodos de fraccionamiento (ver apartado 3.5.), las primeras unidades fueron criopreservadas en bolsas de acetato de etileno-vinilo en un volumen de 160 ml, sin ningún procedimiento previo de concentración celular. Una vez adoptada la sedimentación con hidroxietil almidón como método de elección, las unidades fraccionadas pudieron ser criopreservadas en menor volumen, primero en tubos de polipropileno de 4.5 ml (tres criotubos por unidad) y posteriormente en bolsas similares a las anteriores pero de menor capacidad, en un volumen de 24 ml.

Por tanto, si bien las condiciones de criopreservación fueron siempre las mismas durante todo el estudio, el formato utilizado (bolsa o tubo) y el volumen de congelación han ido modificándose a medida que iban siendo optimizados los métodos de fraccionamiento de SCU. Esto exigía que los programas de congelación tuvieran que ser ajustados, procurando reproducir en cada caso la curva óptima de enfriamiento. Paralelamente, y con el fin de comprobar si las distintas modalidades de congelación que hemos utilizado preservaban por igual la SCU, hemos comparado la recuperación y la viabilidad de las células nucleadas y células progenitoras de

unidades de SCU criopreservadas en bolsas (160 o 24 ml) o en criotubos (4.5 ml). Los resultados de ambos estudios se presentan seguidamente.

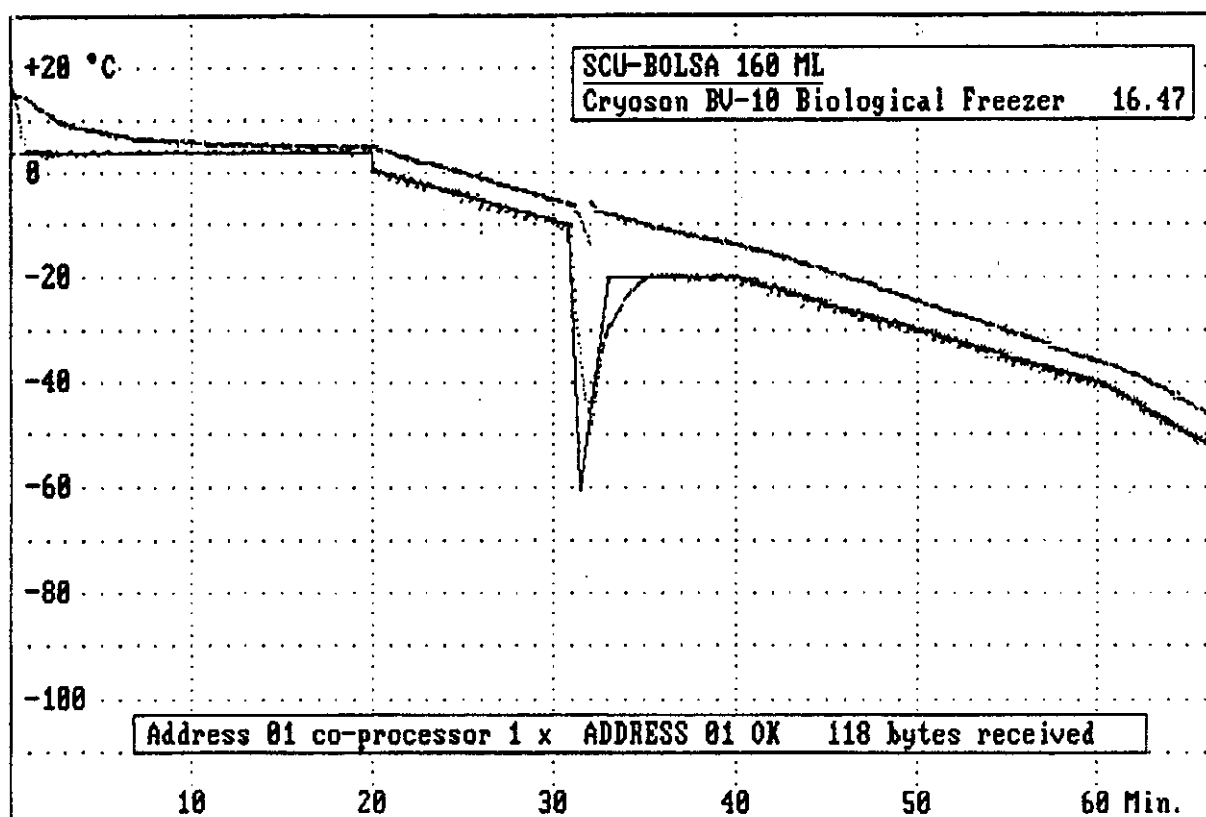
3.6.1.- Optimización de los programas de congelación según formato y volumen.

Para cada una de las tres modalidades de criopreservación (bolsa de 160 ml, bolsa de 24 ml o criotubo de 4.5 ml) se diseñaron específicamente programas de congelación que se diferenciaban solo en aquellos segmentos en los que se induce el cambio de fase y se compensa el calor de fusión a través de una entrada masiva y recortada de nitrógeno líquido en la cámara de congelación (ver apartado 2.3.3.5. de Materiales y Métodos). El objetivo era mantener la pendiente de enfriamiento constante en todos los casos. La figura 17 muestra las curvas de congelación representativas de cada combinación de formato y volumen. Como puede observarse, la velocidad de enfriamiento en las tres curvas fue de $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ antes y después del cambio de fase, existiendo en todas ellas una adecuada neutralización del calor de fusión. Este comportamiento fue extremadamente reproducible en los tres formatos de criopreservación analizados. Por consiguiente, se puede concluir que la congelación de SCU en bolsas de 160 ml, bolsas de 24 ml y criotubos de 4.5 ml mediante los programas específicamente diseñados cumple en todos los casos los requerimientos establecidos de una criopreservación eficaz de células hematopoyéticas (Gorin, 1986).

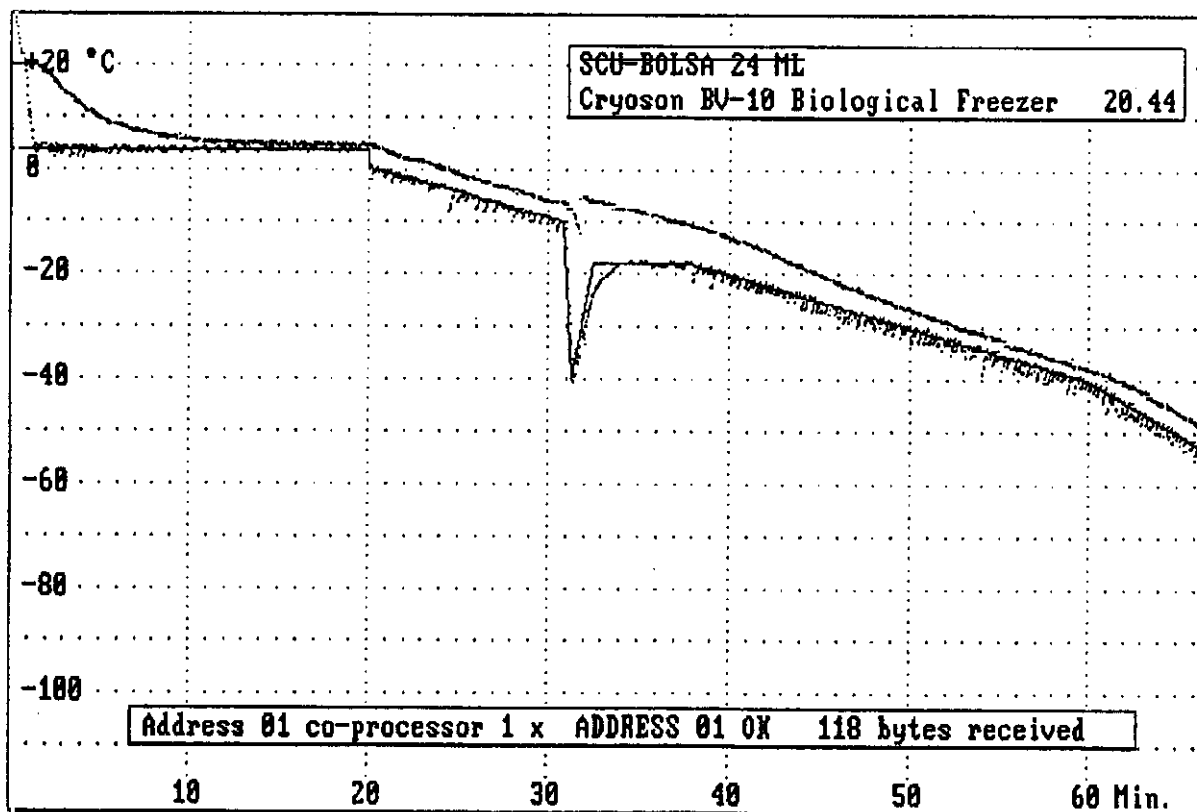
3.6.2.- Viabilidad de SCU criopreservada en diferente formato y volumen.

El ajuste de los parámetros de congelación idóneos para cada combinación de formato y volumen era un paso obligatorio anterior al análisis de posibles diferencias de eficacia en la preservación de células progenitoras de SCU. Una vez optimizados los programas de congelación, realizamos un análisis comparativo de la recuperación de células viables de SCU criopreservada en bolsas de 160 ml, bolsas de 24 ml y criotubos de 4.5 ml. El tiempo que las unidades permanecieron en nitrógeno líquido antes de ser descongeladas para realizar el análisis osciló entre 2 y 16 meses. Las determinaciones llevadas a cabo inmediatamente después de la descongelación consistieron en recuento de células nucleadas, viabilidad por exclusión de azul

A



B



C

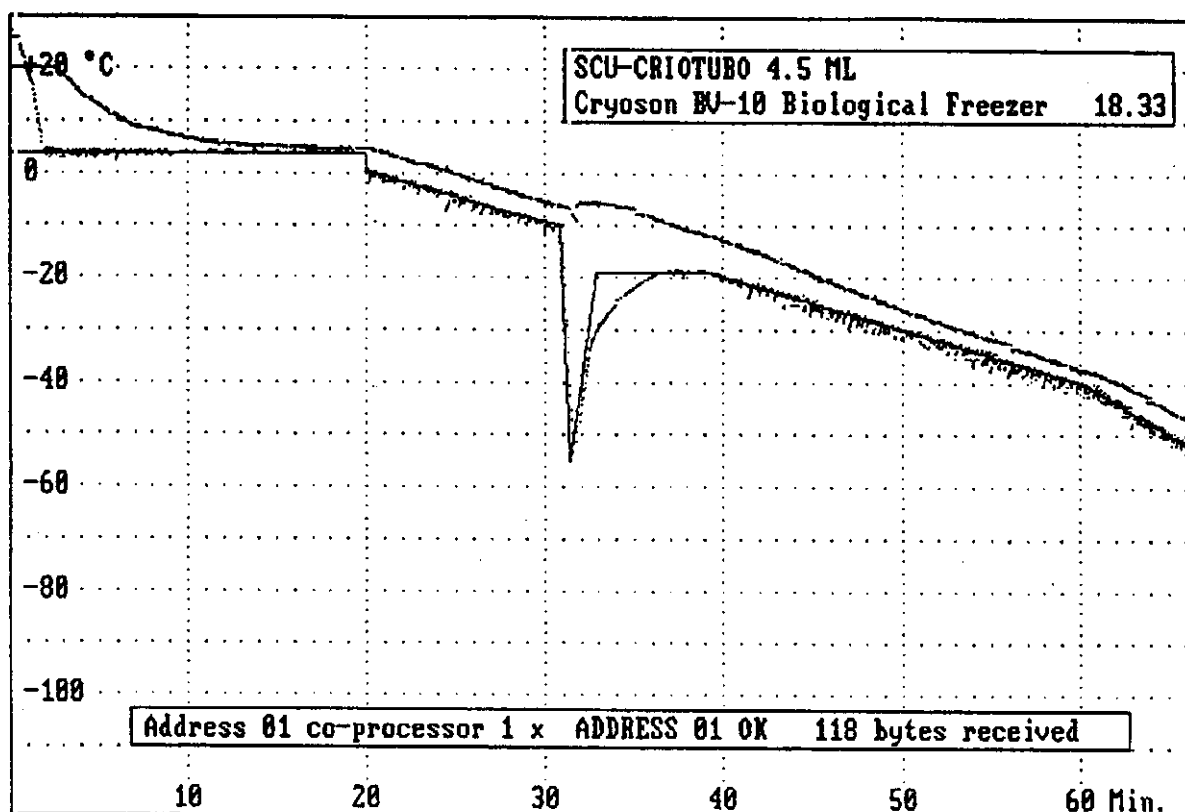


FIGURA 17. Curvas de congelación de SCU en diferente formato y volumen de criopreservación. Los programas de congelación han sido diseñados específicamente para cada modalidad de criopreservación, consiguiéndose en cada una de ellas una velocidad de enfriamiento de $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y una adecuada neutralización del calor de fusión. A. Bolsa de 160 ml. B. Bolsa de 24 ml. C. Criotubo de 4.5 ml.

tripán y progenitores granulocito-macrofágicos analizados mediante ensayos clonogénicos (CFU-GM). El contenido de células nucleadas y CFU-GM antes de la criopreservación sirvieron para calcular su recuperación tras la descongelación.

En la tabla 32 se exponen los resultados obtenidos. La criopreservación en bolsas de 160 ml y en criotubos de 4.5 ml presentaron valores de viabilidad y recuperación de células nucleadas por encima del 80%, mientras que las unidades criopreservadas en bolsas de 24 ml tuvieron unas cifras ligeramente inferiores. Sin embargo, la recuperación de CFU-GM fue superior en las unidades criopreservadas en bolsas de 160 ml (86%) y 24 ml (78%) respecto a las congeladas en criotubos (64%).

TABLA 32. Comparación de diferentes formatos y volúmenes de criopreservación de SCU

	Formato y volumen de criopreservación					
	Bolsa 160 ml	p*	Bolsa 24 ml	p†	Criotubo 4.5 ml	p‡
Viabilidad	83.3 ± 8.7	0.01	77.3 ± 8.9	0.03	83.2 ± 7.3	NS
CN	87.1 ± 15.1	0.02	75.9 ± 19.6	NS	82.6 ± 15	NS
CFU-GM	85.9 ± 43.9	NS	78.3 ± 107.8	NS	64.4 ± 54.3	NS

Viabilidad celular determinada por exclusión de azul tripán, y recuperación de células nucleadas y progenitores granulocito-macrofágicos (porcentaje medio ± ds), obtenidas tras la descongelación de SCU criopreservada en bolsa de 160 ml (n=38), bolsa de 24 ml (n=18) y criotubos de 4.5 ml (n=11).

* Comparación entre bolsa de 160 ml y bolsa de 24 ml.

† Comparación entre bolsa de 24 ml y criotubo de 4.5 ml.

‡ Comparación entre bolsa de 160 ml y criotubo de 4.5 ml.

Abreviaturas: CN, recuperación de células nucleadas; CFU-GM, recuperación de células formadoras de colonias granulocito-macrofágicas; p, prueba de significación estadística (U de Mann-Whitney). NS, diferencia no significativa.

3.6.3.- Efecto del almacenamiento transitorio a -80°C previo al definitivo en nitrógeno líquido a -196°C .

La contaminación del depósito de nitrógeno líquido por virus de la hepatitis B a partir de unidades positivas, y su transmisión entre bolsas de MO criopreservadas y almacenadas en el mismo contenedor, es un hecho descrito, aunque circunstancial (Hawkins y cols., 1996). A pesar de que aún no está suficientemente contrastado ni cuantificado, una manera de minimizar este riesgo consiste en guardar las unidades recientemente congeladas en un contenedor diferente de nitrógeno líquido hasta conocer los resultados de serología, y transferir al depósito de almacenamiento definitivo solo las unidades que resulten negativas. Otra opción es conservar en el mismo contenedor, en fase de vapor las unidades en espera de pruebas serológicas, y en fase líquida las unidades confirmadas negativas. Estas dos posibilidades presentan el inconveniente, en la primera, de tener que destinar un contenedor exclusivo para unidades en cuarentena, y en la segunda, de fluctuaciones importantes de la temperatura durante las aperturas del depósito, o incluso que las unidades en fase de vapor entren en contacto con nitrógeno líquido debido a turbulencias durante el llenado del contenedor. Como una posible alternativa, nosotros hemos

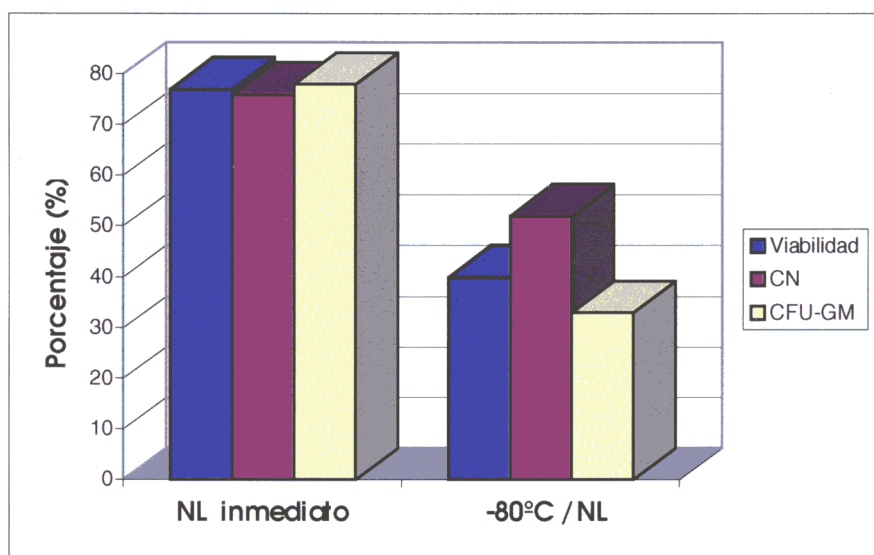


FIGURA 18. Efecto del almacenamiento transitorio a -80°C en la recuperación y viabilidad celular de SCU. La viabilidad celular (azul) y la recuperación de CN (morado) fueron significativamente superiores en SCU criopreservada y almacenada de inmediato en nitrógeno líquido (NL inmediato, $n=18$) vs después de una semana a -80°C en un congelador mecánico (-80°C /NL, $n=13$) ($p<0.001$, U de Mann-Whitney). CN, células nucleadas; CFU-GM, progenitores granulocito-macrofágicos.

probado mantener transitoriamente (siete días) en un refrigerador a -80°C las unidades de SCU criopreservadas, antes de su almacenamiento definitivo en nitrógeno líquido.

El tiempo de conservación a -80°C que consideramos para este experimento fue una semana, toda vez que los informes de serología viral se reciben antes de siete días. En la figura 18 se compara la viabilidad celular y la recuperación de células nucleadas y CFU-GM de unidades de SCU criopreservadas y almacenadas inmediatamente en nitrógeno líquido, frente a las mantenidas una semana a -80°C antes de ser transferidas al depósito de nitrógeno líquido. En estas últimas unidades se produjo una pérdida celular considerable, superior al 50%, lo que demostró que la conservación a -80°C era insuficiente para preservar la viabilidad celular de SCU, al menos cuando se utilizaba después de una congelación controlada. Por tanto, esta estrategia alternativa de cuarentena a -80°C no era asumible, debiéndose utilizar en todo momento la temperatura del nitrógeno líquido (-196°C) para mantener la viabilidad de las células de SCU criopreservadas, tal como se constata en este estudio.

3.7.- Descongelación.

El proceso de descongelación y reinfusión también es un paso crítico a la hora de obtener resultados óptimos en el implante. De hecho, no solo la recuperación de células viables, sino también los posibles efectos secundarios en el paciente derivados de la infusión de los agentes criopreservantes, deben ser contemplados cuando se trata de adoptar una técnica de descongelación óptima.

En nuestro laboratorio quisimos determinar las ventajas de protocolos recientemente aparecidos en la literatura (Rubinstein y cols., 1995) y consistentes en una dilución lenta de la unidad descongelada con una solución de albúmina y dextrano, seguida de una centrifugación para retirar el sobrenadante (ver apartado 2.3.3.6. de Materiales y Métodos). El análisis se llevó a cabo en 18 unidades de SCU criopreservada, comparando este procedimiento con la técnica convencional de descongelación (análisis de la unidad descongelada, sin realizar ningún tipo de procesamiento). Las unidades fueron descongeladas por inmersión en un baño a 37°C. Una alícuota de cada unidad fue procesada de acuerdo al nuevo método de descongelación, y la otra

TABLA 33. Efecto del lavado con dextrano/albúmina tras la descongelación de SCU criopreservada

	Tipo de descongelación		P
	lavado dextrano/albúmina	no lavado	
Viabilidad	76.4 ± 10.1	77.3 ± 8.9	NS
CN	72.9 ± 10.5	75.9 ± 19.6	NS
CFU-GM	86.8 ± 101.1	78.3 ± 107.8	NS

Viabilidad celular determinada por exclusión de azul tripán y recuperación de células nucleadas y progenitores granulocito-macrofágicos (porcentaje medio ± ds) de SCU criopreservada en bolsas de 24 ml tras descongelación y lavado con dextrano 10% y albúmina 5% (dilución 1:2), en comparación con los resultados obtenidos en una alícuota no lavada y diluida 1:10 en Iscove's + SBF 20% (n=18).

Abreviaturas: CN, recuperación de células nucleadas; CFU-GM, recuperación de células formadoras de colonias granulocito-macrofágicas; p, prueba de significación estadística (prueba *t* pareada). NS, diferencia no significativa.

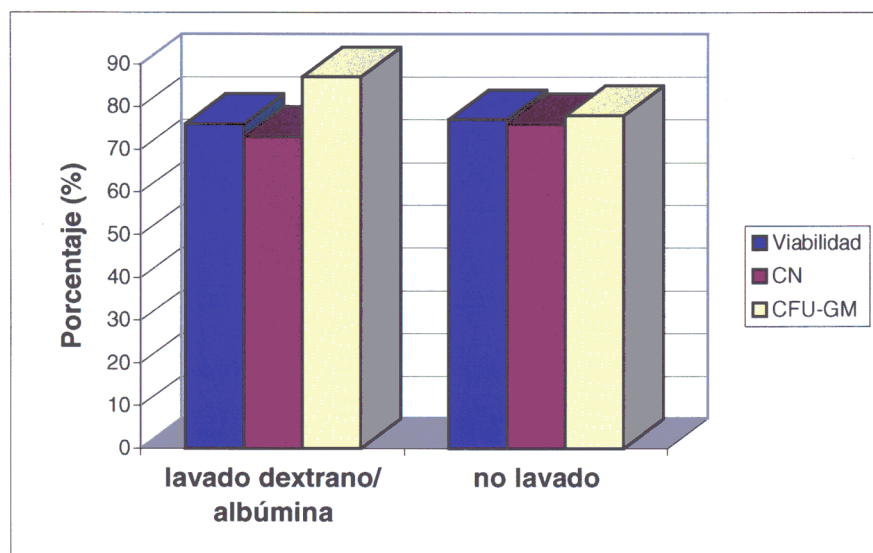


FIGURA 19. Viabilidad y recuperación celular de SCU criopreservada según el tipo de descongelación. No hay diferencias significativas en la viabilidad celular (azul) ni en la recuperación de CN (morado) y CFU-GM (amarillo) en SCU descongelada (n=18), comparando el lavado con dextrano 10% y albúmina 5% (dilución 1:2) frente a una alícuota no lavada y diluida (1:10) en Iscove's + SBF 20%. CN, células nucleadas; CFU-GM, progenitores granulocito-macrofágicos.

fue diluida 1:10 en medio de cultivo (Iscove's + SBF 20%), determinándose en ambas la viabilidad y la recuperación de células nucleadas y CFU-GM. La tabla 33 muestra los resultados de este estudio. Ambos métodos fueron igual de eficaces en cuanto a viabilidad y células totales recuperadas, aunque se observó una recuperación de CFU-GM ligeramente mejor cuando se empleó el método de lavado con dextrano/albúmina (Figura 19). Por tanto, y para futuras aplicaciones, nos inclinamos por el procesamiento con dextrano/albúmina para la descongelación de las unidades de SCU.

4.- VALIDACIÓN DE LAS UNIDADES PROCESADAS DE SCU.

Las unidades que forman parte del Banco de SCU están destinadas a ser empleadas como fuente de células progenitoras hematopoyéticas en pacientes que requieren un trasplante en el curso de su enfermedad. Con el fin de ofrecer la máxima protección, es de particular importancia asegurar la integridad e inocuidad del producto de trasplante un vez finalizado el proceso seguido por el Banco, que comprende desde la obtención, caracterización y fraccionamiento, hasta la congelación y almacenamiento de las unidades. Por ello, el Banco de SCU tiene como imperativo realizar un escrutinio final de todos los resultados antes de validar las unidades procesadas, introducirlos en bases de datos y enviar la información pertinente a los registros de SCU. La finalidad última es disminuir todo lo posible el riesgo clínico inherente al uso de un producto sanguíneo alogénico.

El procedimiento de validación consistió en la revisión de los datos recogidos en formularios diseñados específicamente para capturar la información referente a la historia materna, incidencias obstétricas, obtención de la SCU, procesamiento, escrutinio de infecciones, caracterización de la unidad y almacenamiento definitivo en nitrógeno líquido. Estos impresos facilitaron la obtención de todos los datos necesarios para determinar la elegibilidad de una SCU como fuente potencial de células hematopoyéticas para trasplante.

Para cada unidad de SCU, los datos de obtención, procesamiento, pruebas analíticas y almacenamiento se cumplieron durante las primeras dos semanas. Posteriormente, todos estos datos se revisaron de forma independiente por dos personas del Banco, atendiendo a los criterios de elegibilidad para su almacenamiento definitivo. Las unidades elegibles para ser almacenadas a largo plazo fueron confirmadas como tales, e introducidas en la base de datos del Banco, en el momento de recibirse el tipaje HLA. Las unidades no elegibles en esta primera fase se sometieron a una segunda evaluación, en la que se revisó de nuevo la documentación existente para comprobar la veracidad de los datos y realizar, en su caso, los análisis pendientes o pruebas complementarias que completaran o confirmaran los resultados iniciales.

4.1.- Tipaje HLA. Frecuencias alélicas y de haplotipos en las unidades de SCU procesadas.

El primer paso para proceder a la validación de una unidad de SCU fue disponer de un tipaje HLA con el mayor grado de resolución posible. Este es un requisito imprescindible para poder establecer el nivel de compatibilidad con un eventual receptor y seleccionar una unidad para trasplante.

Durante la última década, la información sobre el polimorfismo del sistema de histocompatibilidad se ha incrementado notablemente gracias a los métodos de tipaje molecular, habiéndose descrito hasta el momento más de 450 alelos en los loci HLA-A, HLA-B y HLA-DRB1. La interpretación de los datos de tipaje y la definición de los genotipos HLA son aspectos que están continuamente en revisión. Por otro lado, el alto grado de polimorfismo HLA hace que los estudios de compatibilidad sean cada vez más complejos, especialmente en el caso de parejas donante/receptor no relacionados, al tenerse que comprobar su compatibilidad para cada antígeno y/o alelo. Todo ello conduce a que el principal objetivo de un Banco de SCU respecto al tipaje HLA sea disponer de un sistema que pueda ajustarse al aumento continuado de información sobre el polimorfismo HLA y a las innovaciones en los métodos de tipaje, al tiempo que ofrezca resultados con la mayor garantía y precisión posibles.

El tipaje HLA basado en técnicas de DNA proporciona un análisis de los alelos HLA con mayor precisión y nivel de resolución que las técnicas serológicas. Por esta razón, las técnicas moleculares se consideran cada vez más como el método de elección para el tipaje de sangre de cordón umbilical. Las unidades de SCU procesadas en nuestro Banco fueron analizadas por un método de genética molecular (*dot-blot* reverso) en los antígenos de clase II (HLA-DR) que proporciona una resolución media. Los antígenos de clase I (HLA-A y HLA-B) se analizaron inicialmente por métodos serológicos, y en la mayoría de las unidades (80%) los resultados obtenidos fueron confirmados a nivel molecular (PCR-SSP). Actualmente, todas las unidades se tipan por genética molecular utilizando los métodos mencionados en clase I y clase II, y además se está implementando el tipaje HLA de clase I mediante la técnica de *dot-blot* reverso que proporciona una resolución media de los alelos HLA-A y HLA-B. En los casos en los que

TABLA 34. Frecuencias de fenotipos HLA-A, -B y -DR determinados serológicamente en SCU y en una muestra representativa de la población española (Martínez-Laso y cols., 1995)

Frecuencia fenotípica (%)			Frecuencia fenotípica (%)		
Antígeno	SCU (n=195)	Pobl. española (n=176)	Antígeno	SCU (n=195)	Pobl. española (n=176)
<i>A1</i>	16	23	<i>B51</i>	16	14
<i>A2</i>	46	45	<i>B52</i>	3	4
<i>A3</i>	19	14	<i>B53</i>	1	2
<i>A23</i>	4	3	<i>B7</i>	12	14
<i>A24</i>	15	14	<i>B8</i>	13	10
<i>A25</i>	3	5	<i>B44</i>	26	29
<i>A26</i>	6	12	<i>B45</i>	5	3
<i>A11</i>	22	16	<i>B13</i>	5	7
<i>A28</i>	8	7	<i>B14</i>	10	19
<i>A29</i>	15	18	<i>B62</i>	8	8
<i>A30</i>	11	12	<i>B63</i>	2	1
<i>A31</i>	1	3	<i>B57</i>	7	6
<i>A32</i>	8	9	<i>B58</i>	1	2
<i>A33</i>	4	6	<i>B18</i>	15	16
<i>A34</i>	1	2	<i>B49</i>	5	7
<i>A blanco</i>	20	12	<i>B50</i>	4	6
			<i>B55</i>	4	3
<i>DR1</i>	20	23	<i>B27</i>	4	5
<i>DR15</i>	19	21	<i>B35</i>	23	13
<i>DR16</i>	3	4	<i>B37</i>	3	4
<i>DR3</i>	19	27	<i>B38</i>	3	3
<i>DR4</i>	22	26	<i>B39</i>	2	4
<i>DR11</i>	29	18	<i>B60</i>	5	2
<i>DR13</i>	22	16	<i>B61</i>	1	2
<i>DR14</i>	5	5	<i>B41</i>	3	2
<i>DR7</i>	32	38	<i>B47</i>	3	1
<i>DR8</i>	3	8	<i>B70</i>	0	1
<i>DR9</i>	2	3	<i>B blanco</i>	21	11
<i>DR10</i>	1	7			
<i>DR blanco</i>	18	8			

Blanco, porcentaje de individuos en los que solo se detecta un alelo en el locus correspondiente.

finalmente no se alcanza un tipaje definitivo con las técnicas empleadas, se recurre a métodos de secuenciación, los cuales ofrecen una resolución máxima en la determinación de alelos HLA.

La determinación de los antígenos HLA-A, -B y -DR pudo ser realizada hasta el momento en 195 de 372 unidades de SCU criopreservadas. Las frecuencias encontradas de los distintos alelos de este sistema altamente polimórfico se compararon con las frecuencias correspondientes en la población española (Martínez-Laso y cols., 1995), tratando de ver si en la muestra de estudio existía una representación adecuada de los diferentes antígenos HLA. Los resultados de este análisis comparativo, empleando los datos obtenidos mediante tipaje serológico, mostraron que las frecuencias HLA-A, -B y -DR no diferían significativamente (Tabla 34). En SCU fue más frecuente la detección de un solo antígeno en al menos uno de los tres loci HLA, dada la menor expresión de antígenos HLA en superficie de las células neonatales (Puri y cols., 1993), aunque no se puede descartar la homocigosidad del alelo correspondiente. Estas dudas quedarán resueltas al proceder al tipaje por genética molecular.

TABLA 35. Haplotipos HLA más frecuentes en SCU y en una muestra representativa de la población española (Martínez-Laso y cols., 1995)

	Frecuencia de haplotipos (%)	
	SCU (n=195)	Población española (n=176)
A29 B44 DR7	4.2	4.5
A1 B8 DR3	3.6	3.4
A30 B18 DR3	2.1	3.1
A33 B14 DR1	0.9	2.6
A2 B7 DR15	2.5	1.9
A11 B27 DR1	0.9	1.4
A3 B7 DR15	0.3	1.4
A2 B18 DR11	1.3	1.1
A30 B13 DR7	0	0.4

Las frecuencias haplotípicas mostradas en la tabla han sido determinadas mediante cálculos de desequilibrio de ligamiento de los loci A, B, DR.

Se define como haplotipo HLA al material genético que se transmite en bloque a través de generaciones debido al desequilibrio de ligamiento entre loci HLA próximos. Los haplotipos HLA de la muestra de estudio se determinaron mediante cálculos de desequilibrio de ligamiento de los loci A, B y DR (Martínez-Laso y cols., 1995). Como puede observarse en la tabla 35, los nueve haplotipos más frecuentes en la población española coincidieron aproximadamente en su frecuencia con los haplotipos encontrados en la muestra de SCU.

4.2.- Criterios finales de elegibilidad.

La determinación del tipaje HLA constituye el punto de partida para proceder a la validación y registro en la base de datos del Banco de las unidades que finalmente cumplen los criterios de elegibilidad. En este apartado se describe el sistema de validación empleado, las unidades HLA tipadas que fueron rechazadas y los motivos de rechazo, y las unidades pendientes de validación. Finalmente, se indican las unidades confirmadas elegibles y enviadas al Registro Español de Donantes de Médula Ósea (REDMO), en donde están accesibles para comprobar por cualquier centro de trasplante la disponibilidad de unidades compatibles.

En la evaluación final de las unidades de SCU, los criterios de exclusión que se siguieron para su validación se resumen en la tabla 36.

4.2.1.- Consentimiento informado.

La obtención de SCU debe realizarse tras la firma ante testigo del consentimiento informado para donación de SCU. Sin embargo, cuando la rapidez del parto impide informar con detalle sobre la finalidad del programa y requerir por escrito la participación en el mismo de la madre/donante, se solicita verbalmente la aceptación para donar la sangre de cordón y se pospone la firma del consentimiento a un máximo de 24 horas después del parto. Si en este plazo la madre/donante se niega en última instancia a dar su consentimiento por escrito, la unidad de SCU se retira del Banco. Esta circunstancia se produjo en 10 donaciones de SCU en las que no hubo una decisión firme de participación tras la obtención de la SCU y, por tanto, las unidades recolectadas fueron desechadas del inventario del Banco.

TABLA 36. Criterios finales de exclusión de unidades de SCU procesadas

Consentimiento informado Ausencia de consentimiento	Historia materna de exposición/riesgo social Consanguinidad Drogadicción intravenosa ^a SIDA o positividad para VIH ^b
Obtención/Procesamiento/Congelación de SCU Ausencia de etiqueta de identificación en la bolsa o datos incorrectos o inadecuados Daño o escape de sangre en la bolsa de recogida Células nucleadas procesadas $<4 \times 10^8$ Fraccionamiento con metilcelulosa o gelatina Viabilidad $<80\%$ tras añadir DMSO	Revisión del Parto Presencia de pus o inflamación en la placenta Embarazo/parto o estado del recién nacido inadecuados Parto vaginal con infección herpética activa
Historia materna y familiares de primer grado Cáncer (excepto carcinomas de piel de células basales o de células espinosas) Enfermedades autoinmunes	Revisión de los resultados analíticos Ensayo de progenitores: CFU-GM = cero Resultados de viabilidad incompletos Resultados tests infecciosos no revisados Cultivo microbiológico positivo Resultados HLA pendientes o incompletos Resultado positivo de al menos alguno de los siguientes marcadores: anticuerpos IgM anti-citomegalovirus (CMV), sífilis, anti-VCH (anticuerpos anti-virus hepatitis C), HBsAg (antígeno de superficie hepatitis B), VIH 1/2
Historia materna y familiar Trastornos hematopoyéticos Inmunodeficiencias hereditarias Coagulopatías hereditarias Enfermedades metabólicas o de depósito	

^aHaber mantenido relaciones sexuales en el último año con una persona que responda a esta descripción.

^bHaber mantenido relaciones sexuales en el último año con alguna persona con SIDA o VIH positividad.

4.2.2.- Obtención/Procesamiento/Congelación.

Las primeras 33 unidades fueron procesadas con metilcelulosa (4) o gelatina (29), y no fueron consideradas elegibles ante el posible riesgo de la utilización clínica de estos agentes de separación (la administración por vía parenteral de metilcelulosa no está aprobada para uso clínico, y el empleo de gelatina conlleva un riesgo de transmisión de la enfermedad de Creutzfeld-Jacob). Todas las demás unidades fueron fraccionadas con hidroxietil almidón, empleando una presentación comercial de este producto aprobada para uso clínico.

El mínimo de células nucleadas con el que se consigue el implante de SCU en la mayoría de los pacientes es 2×10^7 /kg. La probabilidad de que una unidad con un contenido inferior a 4×10^8 células nucleadas supere esta dosis celular mínima y sea utilizada para un trasplante es muy reducida, incluso en pacientes pediátricos de poco peso. Por ello, fijamos este límite para incluir en el Banco solo las unidades de SCU con una celularidad superior. En 5 unidades el número de células nucleadas fue inferior a 4×10^8 y fueron excluidas del Banco.

La viabilidad celular (exclusión de azul tripán) tras la adición de DMSO fue inferior al 80% en 85 unidades de SCU. Esta reducción en la viabilidad guardaba relación con el tiempo transcurrido desde la obtención hasta el procesamiento, y afectaba no solo a células maduras diferenciadas sino también a progenitores hematopoyéticos, tal como se explica en el apartado 3.3. Estas unidades de SCU sufrieron un daño celular significativo en el intervalo previo al procesamiento y, por tanto, no fueron consideradas elegibles.

4.2.3.- Historia materna y familiar.

En un caso, la unidad no fue confirmada elegible por presentar la madre una glomerulonefritis crónica membrano-proliferativa de etiología autoinmune. Aunque no se conoce si realmente existe alguna probabilidad de que un eventual receptor de dicha unidad pueda desarrollar fenómenos autoinmunes (en teoría, a partir de células linfoides fetales que hubieran heredado el defecto), decidimos rechazar esta unidad con historia familiar de autoinmunidad.

La presencia de enfermedades hereditarias fue detectada en tres casos. En una unidad la madre/donante tenía una β -talasemia heterozigota; esta unidad permanece en el inventario del Banco, ya que su uso estaría contraindicado únicamente en pacientes con talasemia. Las otras dos unidades correspondían a un déficit de colinesterasa diagnosticado en la madre/donante, y a una fibrosis quística diagnosticada en una hermana del recién nacido. Ambos procesos no se acompañan de trastornos hematológicos ni se transmiten a través de tejido hematopoyético, por lo que tampoco las unidades de SCU en estos dos casos fueron desechadas.

4.2.4.- Revisión de los resultados analíticos.

En tres unidades se obtuvieron resultados positivos en el cultivo microbiológico (*Bacteroides fragilis*, *Streptococo agalactiae* y *Escherichia coli*), y en otras tres unidades de SCU la madre/donante fue positiva para anticuerpos anti-VHC. Todas ellas no fueron elegibles para su inclusión en el Banco. Tres unidades adicionales quedaron pendientes de validación en espera de revisar los resultados completos de los tests infecciosos.

El tipaje HLA aún no está disponible en 90 unidades de SCU, por lo que estas unidades no han podido ser confirmadas, todavía, en cuanto a su elegibilidad.

4.3.- Envío de unidades de SCU validadas al Registro Español de Donantes de Médula Ósea (REDMO).

Una vez completado el proceso de validación descrito en los apartados anteriores, se han confirmado hasta el momento 139 unidades de SCU que cumplían todos los criterios de elegibilidad. Los datos correspondientes a estas unidades fueron introducidos en la base de datos del Banco como unidades de SCU elegibles, y han sido remitidas al REDMO para su registro. Como se ha mencionado, 93 unidades están pendientes del tipaje HLA o de revisar los resultados de las pruebas microbiológicas para su validación, y 140 fueron rechazadas por los motivos explicados anteriormente.

La información enviada al REDMO de las unidades de SCU confirmadas elegibles consistió en el código de la unidad, el volumen de sangre obtenido, las células nucleadas criopreservadas, el grupo sanguíneo, la etnia de la madre/donante, el tipaje HLA y los resultados de las pruebas infecciosas. Estos datos se enviaron por correo electrónico en un archivo compatible para ser importado directamente en el registro del REDMO, y también se facilitó un informe escrito con estos mismos datos con objeto de detectar posibles errores que pudieran ocurrir en la transmisión electrónica.

En resumen, después del estudio desarrollado en esta tesis, hemos podido estandarizar metodologías y criterios reproducibles que han permitido la creación y establecimiento de un Banco de SCU en el Hospital 12 de Octubre. De esta forma, esperamos reunir en el plazo de tres años un número de unidades con el cual poder responder a las necesidades de un alto porcentaje de pacientes con indicación de trasplante de SCU.

DISCUSIÓN

A lo largo de este trabajo, hemos descrito los procedimientos y estudios desarrollados para llegar a establecer un Banco de Sangre de Cordón Umbilical en el Hospital 12 de Octubre. La primera fase del programa de estandarización metodológica y validación final de unidades procesadas ha dado como resultado el registro de 139 unidades de SCU en el Registro Español de Donantes de Médula Ósea (REDMO), donde pueden ser consultadas las características básicas de cada una de las unidades con objeto de seleccionar la más idónea para un potencial receptor de trasplante de SCU. Un 80%, 60% y 40% de las unidades podrían ser utilizadas, según las series de trasplante de SCU recientemente publicadas (ver más adelante), en pacientes pediátricos y adultos con un peso medio, respectivamente, de 20, 55 y 65 kg.

Los criterios y metodologías establecidos para la puesta en marcha y posterior desarrollo del Banco de SCU -que en un plazo aproximado de 3-5 años podría llegar a almacenar un total de 3.000 unidades- han sido estandarizados en base a este estudio, en principio descriptivo de las propiedades hematopoyéticas e inmunológicas de la muestra analizada de SCU, y posteriormente operativo para la obtención, procesamiento y almacenamiento de las unidades. Nuestro objetivo primordial, por tanto, ha sido el conocimiento de las características biológicas de la SCU y la optimización de los métodos a utilizar para asegurar el mayor potencial de repoblación hematopoyética de las unidades procesadas.

Como ya se ha indicado anteriormente, el valor de establecer un Banco de SCU radica en la oportunidad de un acceso casi inmediato a un producto para trasplante alogénico HLA-tipado y prospectivamente testado para las enfermedades transmisibles más prevalentes (Rubinstein y cols., 1993; Broxmeyer, 1995). Pero además, la SCU presenta algunas propiedades específicas que le confieren un valor adicional respecto a MO y SPM. Concretamente, la incidencia de enfermedad injerto contra huésped (EICH) es menor en los trasplantes de SCU, incluso ante disparidades importantes de los antígenos de histocompatibilidad (Wagner y cols., 1995; Kurtzberg y cols., 1996; Gluckman y cols., 1997; Rubinstein y cols., 1998; Locatelli y cols., 1999), lo cual puede indicar un estado de relativa inmadurez funcional del sistema inmunitario neonatal. Además, la correcta capacidad de repoblación medular demostrada en los trasplantes de SCU a pesar del menor número de células

reinfundidas (Wagner y cols., 1995; Kurtzberg y cols., 1996; Gluckman y cols., 1997; Laporte y cols., 1998; Rubinstein y cols., 1998), sugiere una elevada capacidad proliferativa de los progenitores hematopoyéticos fetales. Nosotros hemos realizado un estudio del contenido de células primitivas y progenitoras, así como de las características de las células linfoides de SCU, en comparación con MO y SPM, cuya conclusión general es que la SCU presenta diferencias biológicas que podrían explicar algunas de sus propiedades distintivas.

La SCU presenta un mayor potencial hematopoyético que la MO y SPM.

En primer lugar, hemos determinado el contenido de células CD34⁺ totales de SCU. Los valores encontrados ($4.66 \pm 4.28 \times 10^6$) son coincidentes con los recientemente hallados en otros laboratorios (Dal Cortivo y cols., 1998; Kogler y cols., 1998a; Pojda y cols., 1998). También ponen de manifiesto una peculiaridad de la SCU, ya que, aunque estas cifras de células con potencial hematopoyético son significativamente menores que las correspondientes a los productos de MO y SPM utilizados para trasplante (100 veces menor), el hecho de que la tasa de injerto en los trasplantes de SCU sea similar a la de los trasplantes de MO o SPM sugiere que la capacidad proliferativa y de reconstitución hematopoyética de las células progenitoras de SCU es significativamente superior.

Asimismo, el porcentaje de células progenitoras más inmaduras en SCU es superior al encontrado en MO y SPM. Estos datos son básicamente coincidentes con trabajos de otros laboratorios (Hao y cols., 1995; Barbosa y cols., 1998). Sin embargo, existen algunas discrepancias en cuanto al fenotipo que define a los progenitores más primitivos en SCU. Así, mientras que algunos han sugerido que el inmunofenotipo comúnmente utilizado para identificar células hematopoyéticas primitivas en MO de adulto (CD34⁺/DR⁻) no es aplicable a SCU, en donde la subpoblación de células CD34⁺ más primitivas coexpresarían el antígeno HLA-DR (Traycoff y cols., 1994b; Huang y cols., 1998), otros autores encuentran que la fracción CD34⁺/38⁻/DR⁻ en SCU comprende la mayoría de las células progenitoras más inmaduras (Hao y cols., 1995; Opie y cols., 1998). Nuestros resultados, a pesar de no haber

realizado un análisis funcional de subpoblaciones CD34⁺ purificadas, concuerdan más con estos últimos estudios y con otros que enmarcan el potencial de reconstitución *in vivo* exclusivamente en células CD34⁺/38⁻ (Larochelle y cols., 1996; Verstegen y cols., 1998). Tanto en estos trabajos como en nuestro análisis, la mayoría de las células CD34⁺/38⁻ en SCU son DR⁻, estando porcentualmente más representadas que en MO y SPM. Esta diferente composición del compartimento de células primitivas CD34⁺/CD38⁻ sugiere, una vez más, un mayor potencial reconstitutivo a largo plazo de la SCU en comparación con las otras dos fuentes de células hematopoyéticas. De hecho, varios estudios funcionales *in vitro* de cuantificación de células LTC-IC (Hows y cols. 1992; Pettengel y cols 1994; Hao y cols., 1995) y estudios de repoblación *in vivo* en el modelo murino SCID/NOD (Wang y cols., 1997; Gan y cols., 1997; Noort y cols., 1998) así lo indican.

Somos conscientes, como ya se indicó en el apartado correspondiente, que el análisis *in vitro* de células primitivas y células progenitoras comprometidas no es el óptimo para evaluar el potencial reconstitutivo de una fuente de células hematopoyéticas, siendo el método de elección el modelo de ratón SCID/NOD (Dick, 1996). Debido también a que los ensayos clonogénicos presentan enorme variabilidad (Lamana y cols., 1998), hemos combinado análisis citofluorimétrico y potencial de formación de colonias para evaluar la presencia de progenitores granulocito-macrofágicos (GM), eritrocíticos (E) y megacariocíticos (Mk). De la conjunción de análisis de marcadores de superficie por citometría de flujo y potencial clonogénico, se puede obtener información valiosa, sobre todo si, como es nuestro caso, pretendemos comparar la SCU con otras fuentes de células hematopoyéticas. Además, estudios comparativos de análisis *in vitro* e *in vivo* permiten correlacionar la capacidad de repoblación con la riqueza en células primitivas CD34⁺/38⁻ (Verstegen y cols., 1998; van Hennick y cols., 1998).

Los datos obtenidos en este trabajo muestran básicamente que, si bien no existen diferencias significativas en la proporción de progenitores comprometidos al linaje GM y Mk determinados por citometría de flujo, la capacidad formadora de colonias es consistentemente mayor en SCU que en MO y SPM, lo cual apoya, en base a lo anteriormente expuesto, la idea de

que la SCU tiene un potencial de repoblación hematopoyética similar, si no mayor, respecto a MO y SPM.

Los resultados obtenidos por nosotros, además, son superponibles a los hallados en otros grupos (Broxmeyer y cols., 1992; Noort y cols., 1998). De hecho, y aunque los valores absolutos de células formadoras de colonias son difícilmente comparables entre distintos laboratorios, dada la variabilidad inherente a la propia metodología de los ensayos clonogénicos, la frecuencia relativa entre BFU-E, CFU-GM y CFU-GEMM encontrada en nuestro estudio es similar a la descrita por otros autores (Baudoux y cols., 1998; Kögler y cols., 1998a).

De nuestros ensayos, también se puede inferir que, al menos para los precursores megacariocíticos, la determinación de células formadoras de colonias (CFU-Mk) podría poner de manifiesto diferencias entre diferentes fuentes hematopoyéticas, puesto que si mediante citometría de flujo no se evidencian diferencias importantes entre SCU, MO y SPM, la capacidad clonogénica es 2 a 3 veces superior en SCU que en SPM.

A esta conclusión también han llegado otros autores (Broxmeyer y cols., 1989; Hows y cols. 1992; Pettengel y cols., 1994; Hao y cols., 1995; Wang y cols., 1997; Lebeurier y cols., 1997). Por tanto, nuestros resultados confirman la hipótesis de que el potencial hematopoyético de la SCU puede ser mayor que el de MO y SPM.

La SCU presenta una inmadurez inmunológica posiblemente responsable de un menor potencial de EICH.

Aparte del mayor potencial de reconstitución hematopoyética de la SCU, una de las mayores ventajas de esta fuente de trasplante es el posible potencial minimizado de aloreactividad. Esto podría venir determinado por una inmadurez inmunológica de la sangre fetal, que, por otra parte, viene sugiriéndose desde hace varios años al constatarse clínicamente

una menor incidencia y severidad de EICH en los trasplantes de SCU (Wagner y cols., 1995, Kurtzberg y cols., 1996; Gluckman y cols., 1997, Rubinstein y cols., 1998; Locatelli y cols., 1999).

Las características de las células linfocitarias de la SCU puestas de manifiesto por nuestro análisis parecen indicar, efectivamente, que el neonato no ha alcanzado un estado de madurez del Sistema Inmune comparable al del adulto. No obstante, hay que destacar el hecho de que dicha inmadurez se circunscribe fundamentalmente a la funcionalidad del mismo, y no a la ausencia de células responsables de la respuesta inmune, ya que el análisis citofluorimétrico que hemos realizado muestra que el número de linfocitos T, B y NK alcanza niveles relativos comparables a los encontrados en sangre adulta.

Esta discrepancia entre un completo desarrollo de la ontogenia linfocitaria en el periodo perinatal y la falta de madurez funcional de la misma, es una evidencia ampliamente aceptada, ya que es bien conocido el hecho de que la plena respuesta inmunológica se adquiere en periodos posnatales (Siegal, 1981; Miyawaki y cols., 1985; Schelonka y cols., 1998; Millet y cols., 1999). De hecho, estudios citométricos de SCU semejantes a los realizados en este trabajo obtienen resultados muy similares (Harris y cols., 1992; Han y cols., 1995; D'Arena y cols., 1998a). Así, hemos encontrado que el 89% de células T $CD4^+$ y el 90% de células B de SCU presentan antígenos de superficie característicos de células inmaduras ($CD45RA$ en linfocitos T $CD4^+$ y $CD5$ en linfocitos B, respectivamente), y que corresponden a poblaciones linfocitarias no primadas antigénicamente (Johannisson y Festin, 1995; Fischer y cols., 1997; Brezinschek y cols., 1997; Klein y cols., 1998). Estos datos son comparables a los que aparecen en la literatura (Harris y cols., 1992; Keever y cols., 1995; Han y cols., 1995; Paloczi y cols., 1998; Paiva y cols., 1998), en donde, además, se describen otras características fenotípicas consistentes con inmadurez a nivel de células T (menor nivel de expresión de $CD3$, mayor frecuencia de linfocitos dobles positivos $CD4^+/CD8^+$ y linfocitos $CD3^-/CD8^+$) y células B (menor nivel de expresión de antígenos HLA de clase II, mayor expresión de $CD9$ e IgM de superficie), que corroboran la naturaleza *naive* de los linfocitos de SCU descrita en nuestro estudio.

La inmadurez fenotípica puede asociarse a una inmadurez funcional también sugerida por nuestro estudio citométrico, que indica que el 71% de linfocitos T son células que coexpresan CD38, una glicoproteína transmembrana que se expresa en fases tempranas de la diferenciación celular (y también en células activadas), cuya función es aún desconocida (Malavasi y cols., 1994). En SCU se demuestra una mayor proporción de linfocitos CD3⁺/CD38⁺, sin que de forma concomitante se detecten en estas células signos de activación (expresión de CD25 o HLA-DR), y que corresponden a la población de células T CD45RA⁺ *naive*, así denominadas por sus características funcionales que denotan que no han sido todavía expuestas a determinantes antigénicos (Prince y cols., 1992; Dianzani y cols., 1994). Es más, esta inmadurez funcional la muestran asimismo la mayoría de las escasas células CD4⁺/CD45RO⁺ encontradas: de la pequeña proporción que del total de linfocitos CD4⁺ en SCU representan un 11.3%, la mayoría (11.2%) presentan características fenotípicas de células llamadas transicionales (coexpresión de CD45RO y CD45RA), que son células que han interactuado recientemente con el antígeno (Kanegane y cols., 1991; Picker y cols., 1993; Lai y cols., 1994), no existiendo apenas células de memoria CD4⁺/CD45RO⁺/RA⁻ (a diferencia de la SPA en donde más del 50% de los linfocitos CD4⁺ presentan este fenotipo). Distintos trabajos indican que durante la transición del estado *naive* al de memoria, las células T expresan CD45RO al tiempo que dejan de expresar CD45RA. Así, tras la activación antigénica de linfocitos T *naive*, se observa una subpoblación de células T transicionales CD45RO⁺/RA⁺ antes de que se complete la conversión fenotípica de CD45RO⁻/RA⁺ a CD45RO⁺/RA⁻ (LaSalle y Hafler, 1991; Hamann y cols., 1996). Por tanto, además del mayor número de linfocitos CD4⁺ *naive* y menor frecuencia de células T de memoria, nuestro estudio revela que la mayoría de las células CD4⁺/CD45RO⁺ en SCU son células inmaduras transicionales que coexpresan CD45RA. Estos hallazgos coinciden con los descritos previamente por otros laboratorios (Bofill y cols., 1994; Chheda y cols., 1996).

Si bien estos datos sugieren fuertemente que las células del sistema inmune neonatal son inmaduras, tanto fenotípica como funcionalmente, no permiten necesariamente relacionarlos con una menor gravedad e incluso incidencia de EICH tras el trasplante de SCU, ya que en este proceso, consistente en una respuesta de rechazo frente a los tejidos del receptor mediada por

linfocitos T del donante reactivos contra antígenos menores de histocompatibilidad, juega un papel determinante la actividad citotóxica, la capacidad aloreactiva y la secreción de mediadores proinflamatorios como IL-2, TNF- α e IFN- γ , funciones efectoras que determinan, en última instancia, el daño tisular. Se podría suponer que aunque la población linfocitaria es inmadura, su capacidad reactiva está plenamente desarrollada. Sin embargo, nuestros datos permiten correlacionar el grado de inmadurez fenotípica con una menor funcionalidad citotóxica y aloreactiva, ya que muestran una presencia modesta de células T con actividad citotóxica y de células T_{H1} y T_{H2} secretoras de citocinas implicadas en dicha actividad.

Así, no solo la proporción de células T CD8⁺ citotóxicas es muy minoritaria en SCU con respecto a SPA (16% vs 30%), sino que no hemos encontrado en sangre fetal células que expresen el antígeno CD57, que no solo sirve como marcador de una subpoblación de linfocitos T citotóxicos, sino que su expresión indica además un estado de diferenciación terminal de células T citotóxicas activadas, con gránulos citoplasmáticos positivos para perforinas (proteínas responsables de la formación de poros transmembrana citolíticos) y granzima B (serina esterasa que puede participar en el proceso citotóxico), y con actividad citolítica espontánea (Berthou y cols., 1995; Mollet y cols., 1998); y aunque un reducido número de linfocitos T en SCU expresan una isoforma de la molécula de adhesión neural N-CAM (CD56) que los identifica igualmente como células efectoras con gran actividad citotóxica (Lanier y cols., 1986; Hoyle y cols., 1998), su frecuencia es significativamente menor que en sangre adulta (0.3% vs 4%). De manera similar, la detección de células NK CD16⁺/CD56⁻ en SCU, prácticamente inexistentes en SPA, junto con la ausencia de células NK CD57⁺, se corresponde con una menor actividad lítica NK de SCU, repetidamente demostrada en estudios funcionales (Harris y cols., 1992; Keever y cols., 1995; Perez-Cruz y cols., 1998). Resultados similares a los nuestros han sido recientemente comunicados por otros autores (D'Arena y cols., 1998a; Paiva y cols., 1998).

Igualmente, el estudio de activación linfocitaria *in vitro* muestra que, a pesar de que los linfocitos de SCU responden de manera eficiente a los agentes químicos utilizados (ésteres de forbol e ionimicina), sólo el 3.4%, 0.4% y 2.5% son células productoras de IL2, IL-4 e IFN- γ ,

respectivamente, a diferencia de los linfocitos adultos, que alcanzan unos porcentajes correspondientes del 37.8%, 2.2% y 18.2%. En SCU, las células mayoritariamente productoras de las citocinas estudiadas son linfocitos CD4⁺ colaboradores, mientras que en SPA la producción de IFN- γ se lleva a cabo tanto por células CD4⁺ como CD8⁺, pudiendo ser este hecho una de las posibles explicaciones de la menor producción de esta citocina, al existir en SCU muy pocas células CD8⁺/CD45RO⁺. Esta menor proporción de células capaces de producir citocinas implicadas en reacciones proinflamatorias está en concordancia con la inmadurez de los linfocitos T de SCU, los cuales no han sido aún activados hacia células tipo T_H1 (secretoras de IL-2 e IFN- γ) o T_H2 (secretoras de IL-4). Las propiedades de los linfocitos de SCU, que nosotros describimos, relativas a la capacidad de producción de citocinas activadoras de linfocitos T y NK e iniciadoras de reacción injerto contra huesped, son coincidentes con estudios realizados en otros laboratorios (Sautois y cols., 1997; Racadot y cols., 1997; Chalmers y cols., 1998).

Por otra parte, la capacidad aloreactiva probablemente es también inferior en los linfocitos de SCU, según puede desprenderse de la menor proporción de linfocitos T que expresan moléculas de adhesión LFA-3 e ICAM-1 (0-2% vs 34-42% en SCU y SPA, respectivamente). Estas proteínas han sido implicadas en el reconocimiento e interacción célula-célula y se ha sugerido su implicación directa en la aloreactividad linfocitaria (Merkenschlager y cols., 1991; Boussiotis y cols., 1994). Concretamente, LFA-3 (CD58) es el ligando de la proteína CD2 (presente en más del 90% de los linfocitos T maduros), promueve la adhesión entre diferentes tipos de células con linfocitos T, aumentando la activación mediada por TCR, y puede ser crítica para la unión de células CD4⁺ a las células presentadoras de antígeno, así como de linfocitos T citotóxicos a sus células diana. La molécula ICAM-1 (CD54) es uno de los ligandos específicos de la integrina β_2 LFA-1 (CD11a) que, como se indica más adelante, participa en una amplia variedad de funciones linfocitarias adhesión-dependientes y que parece tener una gran relevancia en las respuestas inmunes asociadas a EICH (Roy y cols., 1993; Howell y cols., 1999).

Por tanto, nuestros resultados apuntan hacia una capacidad aloreactiva menguada de los linfocitos fetales, en comparación con los adultos, lo cual ha sido también descrito por otros autores (Keever y cols., 1995; Paiva y cols., 1998). La expresión de otras moléculas de adhesión, como LFA-1 y HCAM (CD44), es similar en linfocitos de SCU y SPA, aunque en nuestro análisis se demuestra una densidad disminuida de LFA-1 en los linfocitos T de SCU, de acuerdo con otros estudios (Han y cols., 1995; Keever y cols., 1995). La expresión de LFA-1 es esencial para la estimulación de células T colaboradoras por células presentadoras de antígeno, la lisis celular mediada por linfocitos T citotóxicos, y la adhesión linfocitaria al endotelio, siendo por tanto una integrina que participa de forma muy importante en los procesos de migración linfocitaria y aloreactividad, y que ha sido implicada en los mecanismos de EICH (Harning y cols., 1991; Howell y cols., 1995). Además, la presencia de células CD8⁺ con baja expresión de LFA-1 se ha relacionado con una actividad supresora en SCU que podría asociarse con una menor incidencia de EICH (Han y cols., 1995; Paiva y cols., 1998), probablemente a través de la inhibición de respuestas secundarias en linfocitos CD4⁺ aloestimulados primariamente (Risdon y cols., 1995). Igualmente, en estos estudios las células *naive* CD45RA⁺ también han sido identificadas como células supresoras, existiendo en nuestro análisis una correlación entre la menor densidad de LFA-1 en linfocitos T y el fenotipo CD45RA. En definitiva, estos resultados permiten sugerir que la capacidad de respuesta inmune de la SCU es inferior a la de poblaciones linfocitarias adultas, al no disponer aún los linfocitos fetales de una maquinaria completa de adhesión intercelular.

Todas estas diferencias en el perfil inmunofenotípico y de secreción de citocinas encontradas en linfocitos de SCU respecto a SPA, podrían explicar en su conjunto la observación clínica de una menor incidencia de EICH en pacientes trasplantados con SCU frente a los trasplantes de médula ósea o sangre periférica de adultos. Así, en estudios recientemente publicados y dónde se describen un número considerable de trasplantes de SCU, se puede comprobar que la incidencia y severidad de EICH es significativamente menor que en los pacientes sometidos a trasplante de MO (Wagner y cols., 1995; Kurtzberg y cols., 1996; Gluckman y cols., 1997; Rubinstein y cols., 1998; Locatelli y cols., 1999). Es más, recientemente se ha descrito un modelo humano de EICH *in vitro* en el que se observa una

capacidad significativamente disminuida de la SCU para inducir aloreactividad tipo EICH, asociada a una frecuencia reducida de precursores linfocitarios T citotóxicos aloreactivos (Wang y cols., 1998). En consecuencia, nuestro estudio, junto con otros llevados a cabo en otros laboratorios (Harris, 1992; Han y cols., 1995; Keever y cols., 1995; Chalmers y cols., 1998; Barbey y cols., 1998; Paiva y cols., 1998) permite seguir afirmando que la SCU presenta propiedades distintivas en cuanto a sus características inmunoreactivas.

En resumen, este estudio de las propiedades básicas de la SCU nos ha permitido, en primer lugar, confirmar en nuestro laboratorio resultados comunicados por otros investigadores. Pero, quizás más importantemente, nos ha proporcionado las herramientas de evaluación necesarias para optimizar los procedimientos de obtención, fraccionamiento, criopreservación y descongelación de las unidades almacenadas, lo cual tiene especial trascendencia a la hora de demostrar la integridad del potencial biológico (capacidad clonogénica, contenido en progenitores CD34⁺, etc.) al término del procesamiento de la SCU. De esta manera, se establece un elemento fundamental de control y garantía de las unidades potencialmente trasplantables.

El procedimiento de recogida mediante combinación de punción de la vena umbilical y perfusión de la placenta enriquece la celularidad de la unidad de SCU

Con el fin de potenciar al máximo la celularidad de las unidades almacenadas, hemos recurrido a combinar la fracción de sangre obtenida mediante punción de la vena umbilical, con una segunda fracción de sangre obtenida tras perfusión arteriovenosa de la placenta. De esta forma, el volumen de SCU ha sido, lógicamente, superior al obtenido únicamente por venopunción (132 ml vs 87 ml, en valores medios). Se podría argumentar que un mayor volumen recolectado no supone necesariamente un parámetro determinante *a priori* de una mayor calidad de las unidades de SCU. Sin embargo, el análisis de regresión múltiple que hemos realizado (ver más adelante) demuestra que tanto la celularidad total como el contenido de progenitores hematopoyéticos están determinados por el volumen de la unidad. De hecho, la

riqueza celular alcanzada con la combinación de las dos fracciones es significativamente superior a la conseguida solo con la primera (un 15% más, como media, de células nucleadas). Así, en números absolutos, hemos aumentado la celularidad de las unidades de SCU desde 1.07 ± 0.45 a $1.22 \pm 0.51 \times 10^9$ células. Estas cifras demuestran que esta mejora introducida en el procedimiento de obtención permite aumentar hasta un 60% el número de unidades con $\geq 1 \times 10^9$ células, y por tanto, con posibilidad de ser trasplantadas en sujetos de más de 50 kg superando la dosis celular de 2×10^7 células/kg, sugerida como una dosis suficiente para garantizar el implante en pacientes adultos (Laporte y cols., 1998). Estos porcentajes son difícilmente alcanzables con el método más comúnmente utilizado de recogida única de sangre de la vena umbilical, y nuestro estudio, de hecho, así lo demuestra. Las cifras obtenidas con la primera fracción de la vena umbilical son, asimismo, muy similares a las comunicadas por otros Bancos de SCU que emplean el procedimiento habitual de recogida por venopunción (Thierry y cols., 1990; Rubinstein y cols., 1994; Querol y cols., 1998; Navarrete y cols., 1998; Kogler y cols., 1998b), en los cuales el promedio obtenido de células nucleadas está entre 1.02 y 1.14×10^9 . Además, y en consonancia con nuestros resultados, la adopción de técnicas de recolección de sangre umbilical mediante perfusión arteriovenosa de la placenta similares a la propuesta por nosotros (Turner y cols., 1992; Harris y cols., 1994a), había anticipado ya de forma preliminar la mayor riqueza celular que se consigue en unidades de SCU obtenidas con procedimientos de recogida como el que describimos nosotros.

Estos resultados suponen una contribución significativa, si se tiene en cuenta, como ya se ha indicado anteriormente, que las células nucleadas infundidas por kilogramo de peso del receptor es el parámetro más predictivo del potencial de recuperación hematopoyética. Por ejemplo, en el análisis retrospectivo de 143 trasplantes de SCU comunicados antes de finales de 1996 al registro europeo Eurocord, la recuperación de neutrófilos ($>500/\mu\text{l}$) y de plaquetas ($>20.000/\mu\text{l}$) fué más rápida en los pacientes que recibieron $\geq 3.7 \times 10^7$ células nucleadas / kg de peso (Gluckman y cols., 1997). La mayoría de estos pacientes son niños menores de 6 años y con menos de 20 kg de peso. Sin embargo, dado el número limitado de células de las unidades de SCU, queda la incertidumbre sobre si esta nueva fuente de trasplante es capaz de reconstituir

pacientes adultos o pacientes con más de 45 kg de peso. Aún así, la experiencia en adultos muestra que con una dosis celular media de 2.1×10^7 /kg y un promedio de 55 kg de peso, la sangre de cordón posee un potencial suficiente de reconstitución hematopoyética también en pacientes adultos (Laporte y cols., 1998; Rubinstein y cols., 1998). Por consiguiente, la combinación de las dos fracciones de sangre umbilical obtenidas por venopunción y perfusión de la placenta permitiría, a la luz de nuestro análisis, utilizar el 41% de las unidades de SCU almacenadas en nuestro Banco en pacientes de más de 65 kg de peso, mientras que con la primera fracción el porcentaje hubiera sido únicamente del 30%.

Un problema potencial podría derivarse del aumento consiguiente del tiempo de recogida; sin embargo, dicho lapso es poco significativo, ya que aunque el tiempo invertido en la obtención conjunta de ambas fracciones es necesariamente mayor que si solo se lleva a cabo la recogida de sangre por venopunción (aproximadamente 15 min en lugar de 5 min), en números relativos es insignificante con respecto al invertido en su procesamiento (ver más adelante). Por tanto, el beneficio obtenido en cuanto a células recolectadas es mayor que la pérdida potencial de viabilidad de las mismas. Respecto a posibles incidencias adicionales, como es la mayor posibilidad de contaminación bacteriana, nuestra experiencia muestra que, adoptando medidas rigurosas de asepsia durante el procedimiento de obtención, el riesgo potencial de contaminación es despreciable frente a la efectividad en la recuperación celular. Así, hemos constatado una reducción en la tasa de cultivos positivos (aerobios y anaerobios) de un 11.8% a un 4.7% al aumentar el grado de asepsia del lugar de venopunción, lo cual sitúa el riesgo de contaminación microbiana en cifras semejantes a las obtenidas en unidades de SCU recogidas sin perfusión placentaria (Rubinstein y cols., 1994; Cairo y Wagner, 1997).

En base a todas estas consideraciones y al hecho de que más del 60% de las unidades de SCU obtenidas mediante el procedimiento descrito contienen más de 1×10^9 células nucleadas, hemos tomado recientemente la decisión de establecer este límite para procesar y almacenar solamente aquellas unidades de SCU que superen dicha cifra. Aunque asumimos que con esta medida la tasa de crecimiento del Banco puede verse reducida, consideramos que esta selección de unidades de SCU con una riqueza celular apropiada incrementaría significativamente las

probabilidades de su utilización en pacientes adultos, al proporcionar *a priori* mayores garantías de un implante hematopoyético eficaz que las que ofrecerían unidades de menor riqueza celular.

Podemos concluir, por tanto, que esta modificación en el procedimiento de obtención de SCU supone una mejora sustancial que nos ha permitido alcanzar un rendimiento óptimo en unidades con un potencial repoblador suficiente, no solo en pacientes pediátricos, sino también en receptores adultos de trasplante con ≥ 65 kg de peso.

Un intervalo superior a 12 horas entre la obtención y el procesamiento reduce la viabilidad celular de la unidad de SCU.

Una contribución del trabajo de estandarización metodológica realizado en nuestro Banco ha sido la observación de la influencia negativa que sobre la viabilidad celular ejerce el tiempo transcurrido entre la recogida de las unidades de SCU y su llegada al laboratorio. De este análisis se desprende que las unidades de SCU procesadas en las primeras 12 horas y mantenidas a 4°C durante este tiempo, tienen una viabilidad celular por encima del 90% y muestran valores más altos de eficiencia clonogénica que las unidades procesadas más tarde de 12 horas desde su obtención, en las que se detecta una disminución significativa en la viabilidad celular. Esta observación es relevante puesto que algunos estudios habían sugerido previamente que no se producen pérdidas significativas de células progenitoras hematopoyéticas durante las primeras 48 horas (Broxmeyer y cols., 1989; Rubinstein y cols 1993) y, en consecuencia, muchos centros han incorporado en sus protocolos la aceptación de unidades de SCU obtenidas 24 o incluso 48 horas antes del procesamiento. En estos estudios, así como en el realizado por nosotros, no se evidencia un deterioro importante de la SCU en las primeras 48 horas cuando se analiza la viabilidad celular antes de la criopreservación. Sin embargo, a diferencia de nuestro análisis, en los estudios citados no se evalúa la posibilidad de una excesiva toxicidad inducida por la criopreservación en aquellas unidades almacenadas por un intervalo de tiempo prolongado antes de su recepción en el laboratorio.

Nuestros resultados muestran claramente el efecto nocivo que conlleva la adición del crioprotector cuando la SCU ha permanecido más de 12 horas sin ser procesada. Demostramos que la viabilidad celular (exclusión de azul tripán) y la eficiencia clonogénica (CFU-GM y BFU-E) de los progenitores hematopoyéticos de SCU, ambas determinadas después de añadir dimetilsulfóxido al 10%, disminuyen significativamente en función del tiempo de conservación a 4°C, y especialmente cuando han transcurrido más de 12 horas. Por tanto, el deterioro progresivo que sufren las células de SCU durante el almacenamiento previo al procesamiento de la unidad, se manifiesta especialmente al añadir la solución crioprotectora, y puede no ser detectado si la viabilidad celular se analiza solamente antes de la criopreservación (Broxmeyer y cols., 1989; Abdel-Mageed y cols., 1997).

Concluimos que el tiempo de conservación de la SCU hasta su procesamiento influye en la viabilidad celular y en el potencial clonogénico de las células progenitoras hematopoyéticas (especialmente BFU-E), por lo que es importante procesar y criopreservar rápidamente las unidades de SCU, preferiblemente en las primeras 12 horas desde la recogida. Recientemente se han comunicado resultados muy similares, describiéndose una reducción significativa en el número de células progenitoras hematopoyéticas de SCU a partir de 9 horas de almacenamiento (Shlebak y cols., 1999). Las repercusiones que para el Banco de SCU se derivan de estos resultados son notables, ya que una proporción significativa de los partos se producen fuera de las horas de rutina. La opción que hemos adoptado nosotros es, por un lado, criopreservar todas las unidades de SCU obtenidas durante la noche anterior en días laborables y, por otro, determinar la viabilidad celular en el momento de la llegada al laboratorio de las unidades conservadas más de 12 horas, procesando solamente las que muestren valores superiores al 90%. De esta manera, se pretende reducir al mínimo el número de unidades de SCU depositadas en el Banco que, sin embargo, no serían posteriormente validadas al no superar la tasa del 80% de viabilidad celular tras añadir la solución crioprotectora.

El peso del recién nacido predice la celularidad total de la unidad de SCU.

Todo lo discutido hasta el momento pone de manifiesto lo imprescindible que resulta disponer de herramientas experimentales sólidas que permitan seleccionar entre las unidades recolectadas únicamente aquellas que más interesa procesar y almacenar, dada la gran variabilidad que muestran las unidades de SCU en el contenido de células nucleadas totales y progenitores hematopoyéticos. Diversos factores pueden ser responsables de esta gran heterogeneidad de la SCU, y nuestro estudio también contempla la posibilidad de identificar alguno de estos factores predictivos de celularidad entre diversas variables perinatales materno-fetales. Su definición puede ayudar a establecer criterios de aceptación de una donación como potencial unidad del Banco. Después de un análisis de regresión múltiple en el que se han incluido un número de variables predictoras maternas y fetales, hemos llegado a la conclusión de que el peso del recién nacido puede ser una información de gran ayuda para el Banco de SCU.

Los resultados del estudio de regresión muestran que, siendo la celularidad total el parámetro más importante para considerar una unidad válida para trasplante, la riqueza celular de la SCU viene determinada primariamente por el volumen de la unidad, una vez optimizado el método de recogida de SCU anteriormente discutido, y que ambos parámetros dependen a su vez, al menos en parte, del peso del recién nacido y del número de gestaciones. Los restantes factores estudiados (consumo de tabaco o alcohol, edad de la madre, test de Apgar y sexo del neonato) no han demostrado tener impacto en el rendimiento de la SCU. El poder predictivo del modelo de regresión que determina la celularidad a partir del peso del recién nacido es de un 18%, lo que implica la existencia de otros cofactores perinatales e incluso genéticos, como sugiere un estudio reciente respecto a la contribución del origen étnico de la madre (Shlebak y cols., 1998), que también pueden influir en la riqueza celular de las unidades de SCU. La relación entre el peso del recién nacido y la celularidad de la unidad de SCU ha sido mostrada igualmente por otros autores (Brossard y cols., 1990; Hiatt y cols., 1995; Shlebak y cols., 1998), aunque el análisis de regresión logística múltiple que hemos realizado, a diferencia de los estudios univariantes utilizados en estos trabajos, permite cuantificar con exactitud la

variabilidad del contenido de células nucleadas de SCU que es explicada de forma independiente por el peso del recién nacido.

La importancia de este estudio reside en la posibilidad de decidir prontamente la pertinencia o no de proceder a la obtención de una unidad de SCU. Utilizando la ecuación de regresión calculada para la variable CT (células nucleadas totales) en función del peso del recién nacido, y estableciendo como criterio de selección un mínimo de células prefijado, puede restringirse las donaciones de SCU a las que dieran lugar a las unidades más favorables en celularidad. La consecuencia primordial es que estas unidades tendrían mayor probabilidad de sobrepasar el umbral de dosis celular requerido para trasplante de SCU en pacientes adultos. Pero además, presenta ventajas adicionales, como minimizar el número de procesamientos de unidades con celularidad escasa y optimizar el espacio de almacenamiento en nitrógeno líquido, lo cual redundaría en un abaratamiento del coste del Banco de SCU.

El método de fraccionamiento con hidroxietil almidón es el de elección para la separación de las células repobladoras de la unidad de SCU.

Uno de los primeros objetivos que nos propusimos al iniciar la estandarización del Banco de SCU, fue la validación de los métodos de reducción de volumen de las unidades antes de su criopreservación. La prioridad de estos estudios vino motivada por la limitación de espacio disponible para almacenamiento en nitrógeno líquido de las unidades criopreservadas. Dicha reducción de volumen se consigue por aislamiento de células progenitoras y posterior congelación de una suspensión de las mismas. La conclusión final de nuestro estudio, después de comparar el fraccionamiento con gradientes de densidad y con agentes de sedimentación es que la separación con hidroxietil almidón ofrece los mejores índices de recuperación celular y la máxima seguridad para uso clínico. La técnica de separación con hidroxietil almidón que hemos empleado es una modificación de la descrita originalmente por Rubinstein en 1995, si bien la eficacia demostrada en nuestro laboratorio es similar a la publicada por éste y otros grupos que

han adoptado la misma técnica (Rubinstein y cols., 1995; Querol y cols., 1998; Kogler y cols., 1998b; Regidor y cols., 1999).

A pesar de los buenos resultados comunicados por Harris y cols. (1994a) y Charbord y cols. (1992) empleando, respectivamente, ficoll (1.077 g/ml) y percoll (1.080 g/ml) para separar SCU, nuestra experiencia con gradientes de densidad es insatisfactoria, ya que se llega a perder en torno al 50% de células progenitoras. Resultados similares a los nuestros han sido comunicados por otros autores (Broxmeyer y cols., 1989; Thierry y cols., 1992; Campos y cols., 1995). La discordancia entre la separación con ficoll (1.077 g/ml) y con histopaque (1.083 g/ml) en cuanto a recuperación de células CD34⁺ y progenitores clonogénicos (CFU-GM y BFU-E) que hemos observado en nuestro análisis, podría ser explicada por algún tipo de interacción no conocida entre alguna sustancia de la composición del histopaque y el análisis citométrico de células CD34⁺, o bien por una peor eficiencia clonogénica de células progenitoras separadas con ficoll. En cualquier caso, estos métodos no demuestran ser suficientemente reproducibles, y requieren además transferir la sangre desde la bolsa de recogida a los tubos donde se lleva a cabo la separación, aumentando el riesgo de contaminación bacteriana y fúngica.

Entre los métodos de sedimentación estudiados, la sedimentación con hidroxietil almidón al 1.2% ha sido el finalmente elegido para el fraccionamiento de las unidades de SCU, por cumplir con dos criterios, a nuestro entender, esenciales: i) el uso de este agente no conlleva riesgo para el paciente; ii) la recuperación celular es altamente satisfactoria. Así, la metilcelulosa se ha descartado para el procesamiento de las unidades de SCU al mostrar una recuperación celular ligeramente inferior (80-90%) a la de los otros dos agentes, además de no ser un producto aprobado para uso clínico, y la gelatina también se desestimó por razones ya comentadas anteriormente relativas al riesgo de transmisión de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ver apartado 3.5. de Resultados), aunque la eficacia de separación celular conseguida es superponible a la demostrada por el hidroxietil almidón. La recuperación celular que se consigue con el procedimiento elegido es superior al 90%, siendo el volumen final de la unidad criopreservada de 24 ml. La consecuencia inmediata es que el número de unidades

criopreservadas que pueden almacenarse en el mismo depósito de nitrógeno líquido se multiplica por 5 a 10 veces, dependiendo de la capacidad del sistema de almacenamiento (Rubinstein y cols., 1995). Excepto las primeras 30 unidades procesadas con gelatina, el resto de las más de 400 unidades del Banco de SCU del Hospital 12 de Octubre fraccionadas con hidroxietil almidón ocupan el espacio correspondiente a la mitad de un depósito de nitrógeno líquido de 350 litros de capacidad. Este almacenamiento hubiera sido imposible en tan poco espacio si las unidades de SCU hubieran sido criopreservadas sin ningún procesamiento previo.

En resumen, el fraccionamiento con hidroxietilalmidón permite almacenar un número elevado de unidades de SCU en un espacio relativamente reducido, y establecer así un panel de unidades criopreservadas suficientemente amplio, lo cual resulta esencial para que la SCU pueda ser una fuente práctica de células hematopoyéticas para trasplante. La reducción de volumen conseguida con la sedimentación en sistema cerrado con hidroxietil almidón ofrece ventajas pragmáticas de conveniencia, coste y eficacia en comparación con las alternativas actuales de separación con gradientes de densidad o con otros agentes de sedimentación.

La mayor viabilidad de células progenitoras criopreservadas de SCU se consigue combinando congelación en bolsa, almacenamiento en nitrógeno líquido y descongelación lenta en solución de albúmina/dextrano.

Una de las funciones primordiales de un Banco de SCU consiste en la conservación óptima de unidades congeladas durante tiempo prolongado. La reciente descripción de que el potencial clonogénico de SCU se mantiene íntegro tras 15 años de criopreservación (Kobylka y cols., 1998) despeja muchas incertidumbres y consolida las posibilidades de almacenamiento a largo plazo de SCU como fuente de células hematopoyéticas para futuros trasplantes. Los proyectos de creación de bancos de SCU comienzan a plantearse aproximadamente una década después de haberse establecido los principios generales de criopreservación de MO e iniciado con éxito los primeros ensayos terapéuticos de trasplante autólogo (Mazur, 1970; Gorin, 1986). Dado que la criopreservación es el único método capaz de mantener células progenitoras viables

a largo plazo, los avances logrados durante estos años en el campo de la criobiología hematopoyética han posibilitado el desarrollo y establecimiento de los bancos de SCU de una forma relativamente rápida (Donaldson y cols., 1996; Gao y cols., 1998). Los requerimientos para una criopreservación eficaz de MO han demostrado ser aplicables a SCU (Almici y cols., 1995; Campos y cols., 1995; Donaldson y cols., 1996), como lo habían sido previamente también en el caso de precursores hematopoyéticos de SPM obtenidos por citaféresis.

Para establecer el protocolo de crioconservación de nuestras unidades de SCU, hemos tenido en cuenta, además de los requisitos inherentes a esta técnica (asegurar no solo el mantenimiento en el tiempo de las propiedades hematopoyéticas, sino también la integridad de las células tras la descongelación), determinados aspectos importantes a la hora de aunar las necesidades de ahorro de espacio y el rendimiento óptimo del proceso. Por tanto, ha sido esencial establecer los parámetros que definieran tanto la congelación como la descongelación en las condiciones por nosotros elegidas. Así, en el proceso de congelación hemos interrelacionado: i) el volumen que se va a congelar; ii) la cinética de congelación; iii) la adición de agente crioprotector; y iv) la temperatura de almacenamiento de las muestras criopreservadas.

Como se ha comentado anteriormente, el espacio de almacenamiento puede llegar a suponer una limitación importante en el establecimiento del Banco de SCU. Tras un análisis de diferentes protocolos, hemos llegado a la conclusión de que la congelación en bolsas de 24 ml preserva suficientemente bien los progenitores hematopoyéticos de SCU, con una eficacia similar a la congelación en bolsas de 160 ml, siendo ambas a su vez superiores a la congelación en criotubos de 4.5 ml. Cabe resaltar el hecho de que la necesidad de este análisis ha venido dictada en función de que nuestra experiencia en criopreservación de células progenitoras de MO y SPM desde hace diez años es operativa solamente para volúmenes de congelación de 100 a 160 ml (Lamana y cols., 1990). Por ello, este estudio ha comprendido la comparación de diferentes formatos y volúmenes de congelación y el análisis de la viabilidad y recuperación celular de SCU criopreservada en volúmenes mucho menores, y se ha realizado como requisito previo al empleo de hidroxietil almidón como procedimiento de rutina para el fraccionamiento

de SCU. En cuanto a la validez de nuestros protocolos, podemos concluir que la tasa de recuperación de CFU-GM es casi del 80%, coincidiendo con las descritas por otros autores (Broxmeyer y cols., 1989; Harris y cols., 1994a; Almici y cols., 1996).

Otros dos parámetros cuyo estudio se ha hecho imprescindible han sido la velocidad de congelación y el efecto del agente crioprotector dimetilsulfóxido (DMSO). En la criopreservación de nuestras unidades de SCU, hemos preferido asegurar la dinámica de congelación utilizando programas específicos de congelación para cada uno de los formatos y volúmenes estudiados, y empleando DMSO a la concentración óptima del 10%. Nuestro estudio se ha basado en protocolos establecidos en los que se demuestra que las condiciones óptimas para la conservación viable a largo plazo de células hematopoyéticas incluyen la utilización de DMSO como agente crioprotector en una proporción final del 10%, una velocidad constante de congelación entre 1 y 3°C por minuto antes y después de la fase de transición (cambio de fase líquida a fase sólida), la compensación del calor de fusión generado durante el cambio de fase, y el almacenamiento en nitrógeno líquido (-196°C) para preservar la viabilidad celular de forma mantenida (Gorin, 1986; Perez-Oteyza y cols., 1998). La importancia de la concentración al 10% de DMSO y de la velocidad de enfriamiento a -1°C/min para la criopreservación óptima de SCU ha sido subrayada por Donaldson y cols. (1996). El empleo de equipos de congelación programada nos ha permitido controlar la velocidad de enfriamiento y la monitorización de todo el proceso, aunque también se han descrito procedimientos de congelación mecánica no programada en un refrigerador a -80°C capaces de mantener una velocidad óptima de enfriamiento (Stiff y cols., 1987; Rubinstein y cols., 1993).

Nuestro estudio indica también que las unidades criopreservadas requieren desde el primer momento temperaturas de almacenamiento inferiores a -80°C, es decir nitrógeno líquido (-196°C), o al menos nitrógeno en fase de vapor (-140°C), puesto que la viabilidad celular decrece de forma muy significativa con el almacenamiento en un congelador mecánico (-80°C). De estos resultados se deduce la imposibilidad de utilizar cualquier sistema de conservación no basado en nitrógeno líquido, ni siquiera durante un periodo transitorio de cuarentena. Estas consideraciones tendrían consecuencias negativas en cuanto a disponibilidad de espacio, en

caso de requerirse este periodo de cuarentena, durante el cual las unidades pendientes de pruebas de esterilidad deberían estar físicamente separadas de las que ya han sido analizadas y se conoce su negatividad. Sin embargo, y como se ha comentado en el apartado 3.6.3. de Resultados, dicha necesidad es por lo menos dudosa, puesto que únicamente existen descripciones esporádicas de transmisión microbiana bolsa a bolsa a través de nitrógeno líquido (Hawkins y cols., 1996; Fountain y cols., 1997). No obstante, en aras de la máxima seguridad para el futuro receptor de un trasplante de SCU, la recomendación más extendida es la de practicar la cuarentena utilizando un contenedor separado de nitrógeno líquido o, en su defecto, emplear una protección externa de la bolsa primaria de congelación, sellada de tal foma que impida el intercambio de material entre la muestra de SCU y el nitrógeno líquido (Tedder y cols., 1995). La conservación de la unidad en vapor de nitrógeno no parece adecuada para este fin, porque supone el riesgo de fluctuaciones de temperatura importantes con cada apertura del depósito de almacenamiento y la subsiguiente pérdida de células viables.

Todos estos resultados indican que las condiciones de congelación que hemos seleccionado para el formato de bolsa de 24 ml son óptimas, y en la actualidad constituyen el procedimiento estándar de criopreservación de las unidades del Banco de SCU.

A esta mayor eficacia de la congelación en bolsas de 24 ml, hay que añadir una serie de ventajas como son el procesamiento de la muestra en sistema cerrado y el aislamiento hermético de las bolsas. Por su parte, las unidades criopreservadas en criotubos, al estar divididas en tres fracciones de 4.5 ml, permitirían la manipulación de una parte de la SCU antes del trasplante con procedimientos de terapia génica o de expansión *ex vivo* de progenitores hematopoyéticos. Además, el espacio requerido para el almacenamiento de criotubos es menor al ocupado por bolsas, especialmente las de mayor tamaño. Sin embargo, el empleo de criotubos implica el procesamiento de la SCU en un sistema abierto, con el consiguiente riesgo de contaminación, y un cierre no hermético que posibilita la entrada de nitrógeno líquido en el interior del tubo. En una valoración de conjunto, hemos considerado prioritarios los factores relativos a la mejor conservación de progenitores hematopoyéticos, mayor grado de esterilidad y tamaño apropiado de las bolsas de 24 ml para la congelación y almacenamiento de las unidades de SCU.

Finalmente, también hemos comparado la descongelación de SCU criopreservada mediante dos procedimientos diferentes. La técnica convencional de descongelación consiste en la inmersión de la unidad de SCU en un baño a 37°C y, en su caso, la reinfusión directa al paciente a través de una vía central. Con ello se persigue minimizar el daño potencial derivado del fenómeno de recristalización intracelular que tiene lugar en descongelaciones más lentas, y reducir el tiempo de exposición a DMSO al diluirse rápidamente la SCU descongelada en el torrente circulatorio. Como contrapartida, la infusión intravenosa de DMSO puede acompañarse de efectos secundarios (vómitos, hipertensión arterial, taquicardia, broncoespasmo). Los intentos por retirar el DMSO mediante lavado con solución salina generalmente se han acompañado de pérdidas importantes en la celularidad de las unidades descongeladas (Broxmeyer y cols., 1989), razón por la que algunos no recomiendan este tipo de manipulaciones (Broxmeyer, 1995).

Sin embargo, recientemente se ha descrito un nuevo método de descongelación que aumenta la viabilidad celular *in vitro*, consistente en una dilución lenta de la unidad descongelada con una solución de albúmina y dextrano, seguida de una centrifugación para retirar el sobrenadante (Rubinstein y cols., 1995). El fundamento por el que se propone este método se basa en una reducción progresiva de la concentración extracelular de DMSO, amortiguándose de esta manera el choque hipotónico sufrido por las células durante la descongelación y reinfusión directa. El beneficio clínico de este tratamiento ha sido contrastado en una serie de trasplantes de SCU, en la que los pacientes reinfundidos con SCU procesada con este nuevo método experimentaron una aceleración en la recuperación de neutrófilos en sangre periférica (Kurtzberg y cols., 1996). Nosotros hemos querido comprobar la mayor eficacia de este segundo método de descongelación, obteniendo una recuperación de progenitores hematopoyéticos superior en casi 10 puntos a la conseguida mediante el procedimiento habitual. Por tanto, nuestros resultados reproducen los descritos inicialmente por Rubinstein y cols. (1995).

En definitiva, las condiciones para la criopreservación y descongelación óptimas de SCU que se extraen del estudio que hemos realizado incluyen: i) congelación en bolsas de 24

ml, con DMSO al 10% y velocidad de enfriamiento de $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$; ii) almacenamiento inmediato en nitrógeno líquido; y iii) descongelación lenta en solución de albúmina/dextrano. Esta combinación de factores es la que, en nuestra experiencia, permite la máxima recuperación de células progenitoras tras la criopreservación de SCU.

El objetivo fundamental que hemos perseguido con la estandarización y optimización de los métodos de obtención y procesamiento de la SCU ha sido procurar el máximo potencial de reconstitución hematopoyética en el conjunto de las unidades depositadas en el Banco. Pero además de asegurar un implante rápido y sostenido en los pacientes sometidos a trasplante, las unidades de SCU disponibles deben estar correctamente tipadas y rigurosamente controladas para evitar la transmisión de posibles enfermedades infecciosas o hereditarias. Esto ha exigido poner a punto un complejo proceso de validación de las unidades de SCU que garantice finalmente la idoneidad de las mismas de cara a un futuro trasplante, y en el que se tienen en cuenta diferentes aspectos como son el tipaje HLA, la viabilidad y celularidad total, los antecedentes de trastornos hereditarios en la familia y la esterilidad de la unidad de SCU. En esta fase de validación, es una obligación directa de los responsables del Banco de SCU asegurar la conformidad con los requerimientos predefinidos relativos a la elegibilidad o no elegibilidad de las unidades de SCU para su almacenamiento permanente.

El tipaje HLA por técnicas de genética molecular constituye el método de elección y es un requisito para la validación de las unidades de SCU.

La tipificación de los antígenos HLA en las unidades de SCU de nuestro Banco ha experimentado con el tiempo una mejora ciertamente importante, habiendo desembocado en el tipaje HLA de clase I y clase II por técnicas de genética molecular. En la actualidad, el tipaje HLA de alta resolución se contempla como uno de los requisitos que deben reunir las unidades de SCU, dentro del proceso de validación desarrollado en nuestro Banco de SCU, para poder ser consideradas elegibles para trasplante.

La determinación mediante métodos de DNA de los alelos DRB1 ha sido una práctica de rutina desde el inicio del Banco de SCU en la búsqueda y selección de unidades para trasplante. Por el contrario, los antígenos HLA-A y -B se han venido definiendo hasta no hace mucho tiempo únicamente por métodos serológicos clásicos, los cuales no son capaces de distinguir entre ciertas variantes alélicas fenotípicamente muy similares que reaccionan con un mismo antisuero. En el transcurso de este estudio, hemos implementado el tipaje HLA-A y -B de manera que, en la actualidad, después de una primera fase de tipaje serológico, todas las unidades de SCU de nuestro Banco se tipan en clase I y clase II por técnicas de genética molecular, empleando procedimientos de laboratorio en conformidad con los estándares de la Asociación Europea de Inmunogenética (European Foundation for Immunogenetics) (Curtoni, 1993). Consideramos que solo de esta manera, al identificar con mayor grado de precisión el nivel de compatibilidad de los trasplantes de SCU, es posible evaluar la importancia clínica de las diferencias HLA entre donante y receptor. La mayor capacidad resolutive de las técnicas moleculares respecto a las serológicas en la tipificación HLA de clase I se muestra en un estudio reciente, en donde se descubren disparidades HLA-A o HLA-B en el 7% y 27%, respectivamente, de parejas donante/receptor inicialmente compatibles (Scott y cols., 1998). La importancia clínica de tales diferencias aún no está claramente definida. Así, existen casos aislados de trasplantes de MO en los que se han implicado alorespuestas originadas por diferencias de un solo aminoácido en subtipos HLA-B44, tanto en el rechazo de injerto (Fleischhauer y cols., 1990) como en la aparición de EICH (Keever y cols., 1994). Por el contrario, datos preliminares sobre disparidades a nivel HLA-C y -DQB1 ponen de manifiesto que estas diferencias no afectan al resultado clínico del trasplante de SCU (Elia y cols., 1999).

Por tanto, a pesar de no conocerse aún cual es el nivel óptimo de resolución que debería perseguirse en el tipaje HLA de las unidades de SCU, creemos que la caracterización genotípica de los loci HLA-A, -B y -DRB1 permitirá una selección de parejas donante/receptor más apropiada que en la actualidad. Los actuales procedimientos de búsqueda de unidades compatibles solo contemplan el tipaje serológico de los antígenos HLA-A y -B, además del tipaje molecular de alta resolución a nivel DRB1. Debido a la relativa inmadurez de las células linfoides de SCU, y a la menor incidencia y severidad de EICH observada en los trasplantes de

SCU, generalmente se consideran aceptables diferencias de 1 o 2 antígenos HLA entre la unidad de SCU y el receptor (Gluckman y cols., 1997; Rubinstein y cols., 1998). Sin embargo, los datos disponibles se basan sobre todo en estudios multicéntricos retrospectivos con regímenes de acondicionamiento pretrasplante diferentes y sin tipaje molecular de alta resolución en los antígenos de clase I y II en muchos de los casos, por lo que la relación que pueda existir entre la tasa de implante o de EICH y el grado de disparidad HLA no está todavía claramente definida. La determinación por técnicas moleculares de los alelos HLA-A, -B y -DRB1 en las unidades de SCU facilitará en gran medida la realización de este tipo de análisis y, por tanto, la identificación de las unidades más idóneas para receptores de futuros trasplantes de SCU. Nuestra decisión de tipar molecularmente todas las unidades de SCU como requisito previo a su validación obedece fundamentalmente a criterios de calidad, y pretende así poder evaluar con mayor exactitud las consecuencias clínicas derivadas de la disparidad HLA en el trasplante de SCU.

El estudio de frecuencias alélicas y haplotipos HLA en las unidades de SCU que hemos tipado en nuestro centro demuestra una correspondencia muy estrecha entre la distribución observada en la muestra de SCU y la existente en la población española (Martínez-Laso y cols., 1995). Algunos de los haplotipos identificados en SCU también se encuentran con frecuencias similares en países europeos occidentales (A29-B44-DR7, A1-B8-DR3 y A3-B7-DR15) y mediterráneos (A33-B14-DR1). Teniendo en cuenta la posibilidad de realizar trasplantes de SCU con una o dos diferencias HLA sin que exista un riesgo elevado de EICH severa (Wagner y cols., 1995; Kurtzberg y cols., 1996; Rubinstein y cols., 1998), y de acuerdo con estudios de simulación de búsqueda de unidades compatibles de SCU (van Rood y cols., 1998), esta correspondencia de frecuencias HLA permite prever que con un número suficientemente alto (cercano a 10.000) de unidades recolectadas en Madrid (considerada como una población representativa de la mayor parte de la población española), el Banco de SCU del Hospital 12 de Octubre podría proporcionar células a casi el 90% de los pacientes que necesitaran un trasplante de SCU en España.

La elegibilidad final de las unidades de SCU comienza con la selección de donantes y termina con la comprobación de la viabilidad celular de las mismas.

Los criterios que hemos establecido para determinar la integridad de las unidades de SCU y proceder a su almacenamiento definitivo en el Banco de SCU, han sido rigurosamente observados de acuerdo con una serie de estándares descritos en los procedimientos de trabajo. La conformidad en todo momento con estos estándares es crucial para el bien de los donantes y receptores de trasplante, para los responsables del Banco de SCU y, en última instancia, para la comunidad científica y la administración sanitaria. La adherencia a los criterios de exclusión definidos en los procedimientos normalizados de trabajo ha sido comprobada de forma sistemática e independiente por dos miembros del Banco, de forma que solamente se han introducido en la base de datos del Banco de SCU las unidades que cumplían todos los criterios de elegibilidad para un almacenamiento permanente. Dichas unidades son las que finalmente han sido registradas en el REDMO, a través del envío de los datos básicos pertinentes.

El proceso de validación, como se ha indicado previamente, considera toda deficiencia o variación que pudieran darse respecto de los estándares en cualquiera de las fases del procesamiento de las unidades de SCU, y conduce a una selección cuidadosa de las mismas en base a un número amplio de posibilidades de exclusión. El control realizado antes de la donación muestra que un 32% de potenciales madres/donantes son descartadas para la obtención de SCU, fundamentalmente por causas de naturaleza obstétrica, riesgo de infección neonatal, o sufrimiento fetal. El motivo más frecuente de exclusión de las unidades ya recogidas ha sido la contaminación bacteriana, que en todo el periodo de estudio ha supuesto un 9%, si bien hay que señalar que al extremar las medidas de asepsia en la maniobra de punción de la vena umbilical, hemos logrado disminuir esta cifra al 4.7%. Por último, una vez criopreservadas, en la revisión final de los datos correspondientes a cada una de las unidades, la viabilidad celular inferior al 80% tras añadir el DMSO ha sido el criterio que con más frecuencia ha motivado la no elegibilidad de unidades almacenadas (un 65% de las unidades excluidas en esta fase).

El resto de las exclusiones han sido motivadas por causas de diversa índole, incluida la detección de marcadores de hepatitis B y C en el suero de la madre en un pequeño porcentaje. Por el contrario, las tasas de inmunidad materna frente a citomegalovirus y toxoplasma demostradas en nuestra serie son relativamente elevadas, similares a las descritas en una población de mujeres embarazadas de una localidad cercana a Madrid (Pérez-Rivilla y cols., 1996), sin que a pesar de ello hayamos detectado ningún caso de infección congénita producida por alguno de estos dos patógenos. Teniendo en cuenta la baja incidencia de infección congénita por CMV (0.3%) y que la mayoría de los casos se producen en el contexto de una infección recurrente materna (Pérez-Rivilla y cols., 1996), y asimismo que la toxoplasmosis congénita es igualmente muy poco prevalente (se estima, aunque no existen datos procedentes de estudios reglados, que es inferior al 0.1%), consideramos cuestionable la utilidad de la serología materna para investigar una posible infección de SCU por alguno de estos dos agentes. El cultivo de orina o saliva neonatal se utiliza en otros Bancos de SCU para descartar infección congénita por CMV (Rubinstein y cols., 1993). Sin embargo, creemos que la aplicación de tales medidas de despistaje a todas las donaciones tiene una rentabilidad reducida, y podrían ser sustituidas por la detección de estos patógenos únicamente en las unidades de SCU seleccionadas para trasplante, mediante PCR o técnicas de probada sensibilidad.

Por último, nuestro estudio muestra que el control a los 90 días del parto puede ser de gran importancia, aún cuando el hallazgo de causas de exclusión no detectadas en el momento del parto sea estadísticamente poco significativo. En efecto, la rentabilidad en términos de seguridad microbiológica que proporciona este análisis es muy baja, pues aunque el 7.3% de las madres/donantes mostraron seroconversión frente a citomegalovirus o toxoplasma, todas consistieron en una aparente más que verdadera seroconversión, como así lo indican los niveles reducidos de las correspondientes IgGs. Además, solo en un caso se detectó positividad para hepatitis C, lo cual, desde un punto de vista estadístico, es poco relevante, pero quizás sea suficiente para plantear la disyuntiva entre tener que efectuar este control postparto para asegurar la máxima protección, o bien tener que asumir un riesgo derivado de la falta de dicho control. Desgraciadamente, la ausencia de la evaluación postparto en una proporción considerable de madres/donantes (59%) introduce un elemento de conflicto en lo que se refiere

a la posible utilización para trasplante de las unidades de SCU no controladas. No todos los centros realizan esta segunda evaluación y, por tanto, no la consideran una exigencia para la validación final y uso de las unidades en un eventual trasplante.

Otro aspecto adicional que, en nuestra opinión, confiere aún mayor importancia a esta evaluación es la posibilidad de confirmar e incluso resolver el tipaje HLA de la unidad almacenada, ya que en el periodo postparto no es posible hacer dicho tipaje –por técnicas serológicas– hasta en un 17% de los casos, debido a la presencia de anticuerpos anti-HLA maternos. Por lo tanto, es necesario plantear fórmulas para potenciar este control a los 90 días del parto, reforzando ante las madres/donantes de SCU la necesidad de garantizar la máxima seguridad a los futuros receptores de trasplante y, al mismo tiempo, la importancia de descartar enfermedades potencialmente severas (SIDA, hepatitis B, hepatitis C, hemoglobinopatías, enfermedades autoinmunes, etc.) que podrían no ser detectadas sin la práctica del control de cuarentena.

Con estos criterios, y como hemos comentado en un principio, 139 unidades de SCU han podido ser validadas y remitidas al REDMO, lo cual identifica al Banco de Sangre de Cordón Umbilical del Hospital 12 de Octubre, establecido en base a los procedimientos descritos en esta tesis, como el cuarto Banco de SCU de los existentes en España (Memoria Anual sobre Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos de la ONT, 1998), y entre los diez bancos europeos con mayor número de unidades de SCU disponibles para trasplante.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- La SCU muestra una mayor proporción de células primitivas CD34⁺/CD38⁻/DR⁻ y una mayor proliferación de células progenitoras clonogénicas en comparación con MO y SPM del adulto, lo que sugiere un mayor potencial de repoblación hematopoyética.
- 2.- El estudio de las células linfocitarias de SCU confirma una relativa inmadurez fenotípica y funcional de las mismas, lo que permite predecir un menor potencial de enfermedad injerto contra huésped asociado a la SCU.
- 3.- Con la combinación de punción de la vena umbilical y perfusión de la placenta, se ha conseguido incrementar la riqueza celular de las unidades en un 15% que, además, es estadísticamente predecible por el peso del recién nacido. En nuestro Banco, el porcentaje de unidades de SCU potencialmente trasplantables a individuos de más de 65 kg asciende al 41%.
- 4.- En las condiciones de recolección empleadas, la viabilidad celular y la clonogenicidad de la SCU disminuyen significativamente en función del tiempo transcurrido entre la obtención y el procesamiento de las unidades. La pérdida celular puede llegar hasta el 20% cuando el intervalo es mayor de 12 horas.
- 5.- El estudio comparativo de distintos protocolos de separación celular, congelación, almacenamiento y descongelación de SCU ha cristalizado en la estandarización de métodos de procesamiento basada en el empleo de hidroxietil almidón, bolsas de 24 ml, inmersión en nitrógeno líquido y solución de albúmina/dextrano, respectivamente, que consiguen en conjunto preservar casi el 90% del potencial hematopoyético de las unidades.
- 6.- La distribución de frecuencias alélicas y de haplotipos HLA observada es comparable a la existente en la población española. La tipificación de alelos HLA-A, -B y -DRB1 por técnicas de genética molecular, junto con el resto de criterios de validación aplicados, garantizan la idoneidad de las unidades de SCU y la selección de parejas donante/receptor con mayor grado de precisión que en los protocolos de trasplante seguidos en la actualidad.
- 7.- Como consecuencia de este estudio, se ha establecido un Banco de SCU en el Hospital 12 de Octubre de Madrid con la inclusión, hasta el momento, de 139 unidades validadas y potencialmente elegibles, en el contexto del REDMO, para su utilización como fuente de células progenitoras hematopoyéticas para trasplante.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abdel-Mageed, A., del Rosario, M. L. U., Hutcheson, C. E., Iturraspe, J. A., Martínez, G., Pardo, P. J., Eckertt, N., Fisk, D. D., Sugrue, M. W., Roberts, C. G., and Wingard, J. R. (1997). "Effect of temperature variation and duration from collection to processing of umbilical cord blood units on cell number, viability, and clonogenic potential [abstract]". *Blood*, 90 Suppl 1, 996a.
2. Almici, C., Carlo-Stella, C., Mangoni, L., Garau, D., Cottafavi, L., Ventura, A., Armanetti, M., Wagner, J. E., and Rizzoli, V. (1995). "Density separation of umbilical cord blood and recovery of hemopoietic progenitor cells: implications for cord blood banking". *Stem Cells (Dayt)*, 13, 533-40.
3. Almici, C., Carlo-Stella, C., Wagner, J. E., and Rizzoli, V. (1996). "Density separation and cryopreservation of umbilical cord blood cells: evaluation of recovery in short-and long-term cultures". *Acta Haematol*, 95, 171-5.
4. Apperley, J. F., and Reddy, N. (1995). "Mechanism and management of treatment-related gonadal failure in recipients of high dose chemoradiotherapy". *Blood Rev*, 9, 93-116.
5. Barbey, C., Irion, O., Helg, C., Chapuis, B., Grand, C., Chizzolini, C., Jeannet, M., and Roosnek, E. (1998). "Characterisation of the cytotoxic alloresponse of cord blood". *Bone Marrow Transplant*, 22 Suppl 1, S26-30.
6. Barbosa, I. L., de Sousa, M. E., Godinho, M. I., Teixeira, A. M., and Carvalhais, A. (1998). "Analysis of surface markers on CD34+ cells, isolated from cord blood and G-CSF primed peripheral blood". *Bone Marrow Transplant*, 22 Suppl 1, S56.
7. Baudoux, E., Beguin, Y., Cornu, G., Brichard, B., Debruyne, C., De Bruyere, M., De Hemptinne, D., Delforge, A., Deneys, V., Fillet, G., Germeau, N., Joris, I., Lefevre, P., Massy, M., Paulus, J. M., Raymakers, N., Schaaps, J. P., Sondag, D., Van Cauwenberge, J. R., Vermeylen, C., and Strijckmans, P. (1998). "Circadian and seasonal variations of hematopoiesis in cord blood". *Bone Marrow Transplant*, 22 Suppl 1, S12.
8. Bearman, S. I. (1995). "The syndrome of hepatic veno-occlusive disease after marrow transplantation". *Blood*, 85, 3005-20.

9. Berthou, C., Legros-Maida, S., Soulie, A., Wargnier, A., Guillet, J., Rabian, C., Gluckman, E., and Sasportes, M. (1995). "Cord blood T lymphocytes lack constitutive perforin expression in contrast to adult peripheral blood T lymphocytes". *Blood*, 85, 1540-6.
10. Bertolini, F., Lazzari, L., Lauri, E., Corsini, C., Castelli, C., Gorini, F., and Sirchia, G. (1995). "Comparative study of different procedures for the collection and banking of umbilical cord blood". *J Hematother*, 4, 29-36.
11. Bofill, M., Akbar, A. N., Salmon, M., Robinson, M., Burford, G., and Janossy, G. (1994). "Immature CD45RA(low)RO(low) T cells in the human cord blood. I. Antecedents of CD45RA+ unprimed T cells". *J Immunol*, 152, 5613-23.
12. Bogdanic, V., Nemet, D., Kastelan, A., Latin, V., Petroveck, M., Brkljacic-Surlakovic, L., Kerhin-Brkljacic, V., Aurer, I., Konja, J., Masic, M., and y cols. (1993). "Umbilical cord blood transplantation in a patient with Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia". *Transplantation*, 56, 477-9.
13. Borgstrom, B., and Bolme, P. (1994). "Thyroid function in children after allogeneic bone marrow transplantation". *Bone Marrow Transplant*, 13, 59-64.
14. Boussiotis, V. A., Freeman, G. J., Griffin, J. D., Gray, G. S., Gribben, J. G., and Nadler, L. M. (1994). "CD2 is involved in maintenance and reversal of human alloantigen- specific clonal anergy". *J Exp Med*, 180, 1665-73.
15. Brezinschek, H. P., Foster, S. J., Brezinschek, R. I., Dorner, T., Domiati-Saad, R., and Lipsky, P. E. (1997). "Analysis of the human VH gene repertoire. Differential effects of selection and somatic hypermutation on human peripheral CD5(+)/IgM+ and CD5(-)/IgM+ B cells". *J Clin Invest*, 99, 2488-501.
16. Brichard, B., Vermylen, C., Ninane, J., Cornu, G., Deneys, V., and De Bruyere, M. (1995). "Transplantation of umbilical cord blood in a refractory lymphoma". *Pediatr Hematol Oncol*, 12, 79-81.

17. Brichard, B., Vermynen, C., Ninane, J., and Cornu, G. (1996). "Persistence of fetal hemoglobin production after successful transplantation of cord blood stem cells in a patient with sickle cell anemia". *J Pediatr*, 128, 241-3.
18. Brossard, Y., Van Niftrik, J., De Lachaux, V., Huchet, J., Chavinie, J., Francoual, C., Lemanceau, G., Benbunan, M., Gerota, I., Traineau, R., and y cols. (1990). "Collection of placental blood with a view to hemopoietic reconstitution". *Nouv Rev Fr Hematol*, 32, 427-9.
19. Broxmeyer, H. E., Douglas, G. W., Hangoc, G., Cooper, S., Bard, J., English, D., Arny, M., Thomas, L., and Boyse, E. A. (1989). "Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 3828-32.
20. Broxmeyer, H. E., Gluckman, E., Auerbach, A., Douglas, G. W., Friedman, H., Cooper, S., Hangoc, G., Kurtzberg, J., Bard, J., and Boyse, E. A. (1990). "Human umbilical cord blood: a clinically useful source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells". *Int J Cell Cloning*, 8 Suppl 1, 76-89.
21. Broxmeyer, H. E., Kurtzberg, J., Gluckman, E., Auerbach, A. D., Douglas, G., Cooper, S., Falkenburg, J. H., Bard, J., and Boyse, E. A. (1991). "Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulating cells in human clinical transplantation". *Blood Cells*, 17, 313-29.
22. Broxmeyer, H. E., Hangoc, G., Cooper, S., Ribeiro, R. C., Graves, V., Yoder, M., Wagner, J., Vadhan-Raj, S., Benninger, L., Rubinstein, P., and y cols. (1992). "Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 4109-13.
23. Broxmeyer, H. E. (1995). "Questions to be answered regarding umbilical cord blood hematopoietic stem and progenitor cells and their use in-transplantation". *Transfusion*, 35, 694-702.
24. Cairo, M. S., and Wagner, J. E. (1997). "Placental and/or umbilical cord blood: an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation". *Blood*, 90, 4665-78.

25. Campos, L., Roubi, N., and Guyotat, D. (1995). "Definition of optimal conditions for collection and cryopreservation of umbilical cord hematopoietic cells". *Cryobiology*, 32, 511-5.
26. Carreras, E., Bertz, H., Arcese, W., Vernant, J. P., Tomas, J. F., Hagglund, H., Bandini, G., Esperou, H., Russell, J., de la Rubia, J., Di Girolamo, G., Demuynck, H., Hartmann, O., Clausen, J., Ruutu, T., Leblond, V., Iriando, A., Bosi, A., Ben-Bassat, I., Koza, V., Gratwohl, A., and Apperley, J. F. (1998). "Incidence and outcome of hepatic veno-occlusive disease after blood or marrow transplantation: a prospective cohort study of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. European Group for Blood and Marrow Transplantation Chronic Leukemia Working Party". *Blood*, 92, 3599-604.
27. Chalmers, I. M., Janossy, G., Contreras, M., and Navarrete, C. (1998). "Intracellular cytokine profile of cord and adult blood lymphocytes". *Blood*, 92, 11-8.
28. Charbord, P., Newton, I., Schaal, J. P., and Herve, P. (1992). "The separation of human cord blood by density gradient does not induce a major loss of progenitor cells". *Bone Marrow Transplant*, 9 Suppl 1, 109-10.
29. Chheda, S., Palkowetz, K. H., Rassin, D. K., and Goldman, A. S. (1996). "Deficient quantitative expression of CD45 isoforms on CD4+ and CD8+ T cell subpopulations and subsets of CD45RA(low)CD45RO(low) T cells in newborn blood". *Biol Neonate*, 69, 128-32.
30. Civin, C. I., Strauss, L. C., Brovall, C., Fackler, M. J., Schwartz, J. F., and Shaper, J. H. (1984). "Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG- 1a cells". *J Immunol*, 133, 157-65.
31. Clay, M., Kline, W., and McCullough, J. (1984). "The frequency of granulocyte-specific antibodies in postpartum sera and a family study of the 6B antigen". *Transfusion*, 24, 252-5.

32. Cohen, A., van Lint, M. T., Uderzo, C., Rovelli, A., Lavagetto, A., Vitale, V., Morchio, A., Locasciulli, A., Bacigalupo, A., and Romano, C. (1995). "Growth in patients after allogeneic bone marrow transplant for hematological diseases in childhood". *Bone Marrow Transplant*, 15, 343-8.
33. Cohen, S. B., Dominiguez, E., Lowdell, M., and Madrigal, J. A. (1998). "The immunological properties of cord blood: overview of current research presented at the 2nd EUROCORD workshop". *Bone Marrow Transplant*, 22 Suppl 1, S22-5.
34. Collins, P. C., Miller, W. M., and Papoutsakis, E. T. (1998). "Stirred culture of peripheral and cord blood hematopoietic cells offers advantages over traditional static systems for clinically relevant applications". *Biotechnol Bioeng*, 59, 534-43.
35. Confer, D. L. (1997). "Unrelated marrow donor registries". *Curr Opin Hematol*, 4, 408-12.
36. Curtoni, E. S. (1993). "European Foundation for Immunogenetics: a continental collaboration". *Hum Immunol*, 38, 185-6.
37. Dal Cortivo, L., Marolleau, J. P., Gluckman, E., Chavinie, J., Brossard, Y., and Benbunan, M. (1998). "The Paris Cord Blood Bank". *Bone Marrow Transplant*, 22 Suppl 1, S11.
38. D'Arena, G., Musto, P., Cascavilla, N., Di Giorgio, G., Fusilli, S., Zendoli, F., and Carotenuto, M. (1998). "Flow cytometric characterization of human umbilical cord blood lymphocytes: immunophenotypic features". *Haematologica*, 83, 197-203.
39. Deeg, H. J., and Socie, G. (1998). "Malignancies after hematopoietic stem cell transplantation: many questions, some answers". *Blood*, 91, 1833-44.
40. Denning-Kendall, P. A., Nicol, A., Horsley, H., Donaldson, C., Bradley, B., and Hows, J. M. (1998). "Is in vitro expansion of human cord blood cells clinically relevant?". *Bone Marrow Transplant*, 21, 225-32.

41. Dianzani, U., Funaro, A., DiFranco, D., Garbarino, G., Bragardo, M., Redoglia, V., Buonfiglio, D., De Monte, L. B., Pileri, A., and Malavasi, F. (1994). "Interaction between endothelium and CD4+CD45RA+ lymphocytes. Role of the human CD38 molecule". *J Immunol*, 153, 952-9.
42. Dick, J. E. (1996). "Normal and leukemic human stem cells assayed in SCID mice". *Semin Immunol*, 8, 197-206.
43. Donaldson, C., Armitage, W. J., Denning-Kendall, P. A., Nicol, A. J., Bradley, B. A., and Hows, J. M. (1996). "Optimal cryopreservation of human umbilical cord blood". *Bone Marrow Transplant*, 18, 725-31.
44. Elia, L., Arcese, W., Torello, M., Iori, A. P., Guglielmi, C., Perrone, M. P., Screnci, M., Sprovieri, T., Rapanotti, M. C., and Cimino, G. (1999). "HLA-C and HLA-DQB1 compatibility in unrelated cord blood transplants". *Haematologica*, 84, 530-534.
45. Fischer, M., Klein, U., and Kuppers, R. (1997). "Molecular single-cell analysis reveals that CD5-positive peripheral blood B cells in healthy humans are characterized by rearranged V kappa genes lacking somatic mutation". *J Clin Invest*, 100, 1667-76.
46. Fleischhauer, K., Kernan, N. A., RJ, O. R., Dupont, B., and Yang, S. Y. (1990). "Bone marrow-allograft rejection by T lymphocytes recognizing a single amino acid difference in HLA-B44". *N Engl J Med*, 323, 1818-22.
47. Fountain, D., Ralston, M., Higgins, N., Gorlin, J. B., Uhl, L., Wheeler, C., Antin, J. H., Churchill, W. H., and Benjamin, R. J. (1997). "Liquid nitrogen freezers: a potential source of microbial contamination of hematopoietic stem cell components". *Transfusion*, 37, 585-91.
48. Gabutti, V., Foa, R., Mussa, F., and Aglietta, M. (1975). "Behaviour of human hematopoietic stem cells in cord and neonatal blood". *Haematologica (Roma)*, 4, 60-65.

49. Gan, O. I., Murdoch, B., Larochelle, A., and Dick, J. E. (1997). "Differential maintenance of primitive human SCID-repopulating cells, clonogenic progenitors, and long-term culture-initiating cells after incubation on human bone marrow stromal cells". *Blood*, 90, 641-50.
50. Gao, D. Y., Chang, Q., Liu, C., Farris, K., Harvey, K., McGann, L. E., English, D., Jansen, J., and Critser, J. K. (1998). "Fundamental cryobiology of human hematopoietic progenitor cells. I: Osmotic characteristics and volume distribution". *Cryobiology*, 36, 40-8.
51. Gardiner, C. M., Meara, A. O., and Reen, D. J. (1998). "Differential cytotoxicity of cord blood and bone marrow-derived natural killer cells". *Blood*, 91, 207-13.
52. Gluckman, E., Broxmeyer, H. A., Auerbach, A. D., Friedman, H. S., Douglas, G. W., Devergie, A., Esperou, H., Thierry, D., Socie, G., Lehn, P., and y cols. (1989). "Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling". *N Engl J Med*, 321, 1174-8.
53. Gluckman, E. (1994). "European organization for cord blood banking". *Blood Cells*, 20, 601-8.
54. Gluckman, E., Rocha, V., Boyer-Chammard, A., Locatelli, F., Arcese, W., Pasquini, R., Ortega, J., Souillet, G., Ferreira, E., Laporte, J. P., Fernandez, M., and Chastang, C. (1997). "Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group". *N Engl J Med*, 337, 373-81.
55. Gluckman, E., Rocha, V., Chastang, C., on behalf of Eurocord-Cord Blood Transplant Group (1998). "Cord blood hematopoietic stem cells: biology and transplantation". *Hematology (American Society of Hematology, Washington, DC)*, 1-14.
56. Gorin, N. C. (1986). "Collection, manipulation and freezing of haemopoietic stem cells". *Clin Haematol*, 15, 19-48.

57. Gratwohl, A., Hermans, J., Baldomero, H., Tichelli, A., Goldman, J. M., and Gahrton, G. (1996). "Indications for haemopoietic precursor cell transplants in Europe. European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT)". *Br J Haematol*, 92, 35-43.
58. Greiner, D. L., Hesselton, R. A., and Shultz, L. D. (1998). "SCID mouse models of human stem cell engraftment". *Stem Cells*, 16, 166-77.
59. Güenechea, G., Segovia, J. C., Albella, B., Lamana, M., Ramirez, M., Regidor, C., Fernandez, M. N., and Bueren, J. A. (1999). "Delayed engraftment of nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice transplanted with ex vivo-expanded human CD34(+) cord blood cells". *Blood*, 93, 1097-105.
60. Hahn, T., Shulman, L. M., Ben-Hur, H., Karov, Y., Barak, V., Handgretinger, R., and Barak, Y. (1994). "Differential responses of fetal, neonatal, and adult myelopoietic progenitors to interferon and tumor necrosis factor". *Exp Hematol*, 22, 114-21.
61. Hamann, D., Baars, P. A., Hooibrink, B., and van Lier, R. W. (1996). "Heterogeneity of the human CD4+ T-cell population: two distinct CD4+ T- cell subsets characterized by coexpression of CD45RA and CD45RO isoforms". *Blood*, 88, 3513-21.
62. Han, P., Hodge, G., Story, C., and Xu, X. (1995). "Phenotypic analysis of functional T-lymphocyte subtypes and natural killer cells in human cord blood: relevance to umbilical cord blood transplantation". *Br J Haematol*, 89, 733-40.
63. Hansen, J. A., Gooley, T. A., Martin, P. J., Appelbaum, F., Chauncey, T. R., Clift, R. A., Petersdorf, E. W., Radich, J., Sanders, J. E., Storb, R. F., Sullivan, K. M., and Anasetti, C. (1998). "Bone marrow transplants from unrelated donors for patients with chronic myeloid leukemia". *N Engl J Med*, 338, 962-8.
64. Hao, Q. L., Shah, A. J., Thiemann, F. T., Smogorzewska, E. M., and Crooks, G. M. (1995). "A functional comparison of CD34 + CD38- cells in cord blood and bone marrow". *Blood*, 86, 3745-53.

65. Harning, R., Pelletier, J., Lubbe, K., Takei, F., and Merluzzi, V. J. (1991). "Reduction in the severity of graft-versus-host disease and increased survival in allogenic mice by treatment with monoclonal antibodies to cell adhesion antigens LFA-1 alpha and MALA-2". *Transplantation*, 52, 842-5.
66. Harris, D. T., Schumacher, M. J., Locascio, J., Besencon, F. J., Olson, G. B., DeLuca, D., Shenker, L., Bard, J., and Boyse, E. A. (1992). "Phenotypic and functional immaturity of human umbilical cord blood T lymphocytes". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 10006-10.
67. Harris, D. T., Schumacher, M. J., Rychlik, S., Booth, A., Acevedo, A., Rubinstein, P., Bard, J., and Boyse, E. A. (1994). "Collection, separation and cryopreservation of umbilical cord blood for use in transplantation". *Bone Marrow Transplant*, 13, 135-43.
68. Harris, D. T. (1995). "In vitro and in vivo assessment of the graft-versus-leukemia activity of cord blood". *Bone Marrow Transplant*, 15, 17-23.
69. Hawkins, A. E., Zuckerman, M. A., Briggs, M., Gilson, R. J., Goldstone, A. H., Brink, N. S., and Tedder, R. S. (1996). "Hepatitis B nucleotide sequence analysis: linking an outbreak of acute hepatitis B to contamination of a cryopreservation tank". *J Virol Methods*, 60, 81-8.
70. Hiett, A. K., Britton, K. A., Hague, N. L., Brown, H. L., Stehman, F. B., and Broxmeyer, H. E. (1995). "Comparison of hematopoietic progenitor cells in human umbilical cord blood collected from neonatal infants who are small and appropriate for gestational age". *Transfusion*, 35, 587-91.
71. Hogan, C. J., Shpall, E. J., McNulty, O., McNiece, I., Dick, J. E., Shultz, L. D., and Keller, G. (1997). "Engraftment and development of human CD34(+)-enriched cells from umbilical cord blood in NOD/LtSz-scid/scid mice". *Blood*, 90, 85-96.
72. Howell, C. D., De Victor, D., Li, J., Stephens, J., and Giorno, R. C. (1995). "Liver T cell subsets and adhesion molecules in murine graft-versus-host disease". *Bone Marrow Transplant*, 16, 139-45.

73. Howell, C. D., Li, J., and Chen, W. (1999). "Role of intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte function-associated antigen-1 during nonsuppurative destructive cholangitis in a mouse graft-versus-host disease model". *Hepatology*, 29, 766-76.
74. Hows, J. M., Bradley, B. A., Marsh, J. C., Luft, T., Coutinho, L., Testa, N. G., and Dexter, T. M. (1992). "Growth of human umbilical-cord blood in longterm haemopoietic cultures". *Lancet*, 340, 73-6.
75. Hoyle, C., Bangs, C. D., Chang, P., Kamel, O., Mehta, B., and Negrin, R. S. (1998). "Expansion of Philadelphia chromosome-negative CD3(+)CD56(+) cytotoxic cells from chronic myeloid leukemia patients: in vitro and in vivo efficacy in severe combined immunodeficiency disease mice". *Blood*, 92, 3318-27.
76. Huang, S., Law, P., Young, D., and Ho, A. D. (1998). "Candidate hematopoietic stem cells from fetal tissues, umbilical cord blood vs. adult bone marrow and mobilized peripheral blood". *Exp Hematol*, 26, 1162-71.
77. Huss, R. (1998). "CD34- stem cells as the earliest precursors of hematopoietic progeny". *Exp Hematol*, 26, 1022-3.
78. Issaragrisil, S., Visuthisakchai, S., Suvatte, V., Tanphaichitr, V. S., Chandanayingyong, D., Schreiner, T., Kanokpongsakdi, S., Siritanaratkul, N., and Piankijagum, A. (1995). "Brief report: transplantation of cord-blood stem cells into a patient with severe thalassemia". *N Engl J Med*, 332, 367-9.
79. Jaroscak, J., Martin, P. L., Waters-Pick, B., Armstrong, R. D., Driscoll, T., Howrey, R. P., Castellino, S., Douville, J., Burhop, S., Goltry, K., Rubinstein, P., Smith, A., and Kurtzberg, J. (1998). "A phase I trial of augmentation of unrelated umbilical cord blood transplantation with ex-vivo expanded cells [abstract]". *Blood*, 92 Suppl 1, 646a.
80. Johannisson, A., and Festin, R. (1995). "Phenotype transition of CD4+ T cells from CD45RA to CD45RO is accompanied by cell activation and proliferation". *Cytometry*, 19, 343-52.

81. Kanegane, H., Miyawaki, T., Kato, K., Yokoi, T., Uehara, T., Yachie, A., and Taniguchi, N. (1991). "A novel subpopulation of CD45RA⁺ CD4⁺ T cells expressing IL-2 receptor alpha-chain (CD25) and having a functionally transitional nature into memory cells". *Int Immunol*, 3, 1349-56.
82. Kantrow, S. P., Hackman, R. C., Boeckh, M., Myerson, D., and Crawford, S. W. (1997). "Idiopathic pneumonia syndrome: changing spectrum of lung injury after marrow transplantation". *Transplantation*, 63, 1079-86.
83. Keever, C. A., Leong, N., Cunningham, I., Copelan, E. A., Avalos, B. R., Klein, J., Kapoor, N., Adams, P. W., Orosz, C. G., Tutschka, P. J., and y cols. (1994). "HLA-B44-directed cytotoxic T cells associated with acute graft-versus- host disease following unrelated bone marrow transplantation". *Bone Marrow Transplant*, 14, 137-45.
84. Keever, C. A., Abu-Hajir, M., Graf, W., McFadden, P., Prichard, P., J. O. B., and Flomenberg, N. (1995). "Characterization of the alloreactivity and anti-leukemia reactivity of cord blood mononuclear cells". *Bone Marrow Transplant*, 15, 407-19.
85. Kernan, N. A., Bartsch, G., Ash, R. C., Beatty, P. G., Champlin, R., Filipovich, A., Gajewski, J., Hansen, J. A., Henslee-Downey, J., McCullough, J., and y cols. (1993). "Analysis of 462 transplantations from unrelated donors facilitated by the National Marrow Donor Program". *N Engl J Med*, 328, 593-602.
86. Kinniburgh, D., and Russell, N. H. (1993). "Comparative study of CD34-positive cells and subpopulations in human umbilical cord blood and bone marrow". *Bone Marrow Transplant*, 12, 489-94.
87. Klein, U., Rajewsky, K., and Kuppers, R. (1998). "Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells". *J Exp Med*, 188, 1679-89.
88. Knudtson, S. (1974). "In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood". *Blood*, 43, 357-61.

89. Kobylka, P., Ivanyi, P., and Breur-Vriesendorp, B. S. (1998). "Preservation of immunological and colony-forming capacities of long-term (15 years) cryopreserved cord blood cells". *Transplantation*, 65, 1275-8.
90. Kogler, G., Callejas, J., Sorg, R. V., and Wernet, P. (1998a). "An eight-fold ex vivo expansion of long-term culture-initiating cells from umbilical cord blood in stirred suspension cultures". *Bone Marrow Transplant*, 21 Suppl 3, S48-53.
91. Kogler, G., Sarnowski, A., and Wernet, P. (1998b). "Volume reduction of cord blood by Hetastarch for long-term stem cell banking". *Bone Marrow Transplant*, 22 Suppl 1, S14-5.
92. Kohler, T., Plettig, R., Wetzstein, W., Schaffer, B., Ordemann, R., Nagels, H. O., Ehninger, G., and Bornhauser, M. (1999). "Defining optimum conditions for the ex vivo expansion of human umbilical cord blood cells. Influences of progenitor enrichment, interference with feeder layers, early-acting cytokines and agitation of culture vessels". *Stem Cells*, 17, 19-24.
93. Kohli-Kumar, M., Shahidi, N. T., Broxmeyer, H. E., Masterson, M., Delaat, C., Sambrano, J., Morris, C., Auerbach, A. D., and Harris, R. E. (1993). "Haemopoietic stem/progenitor cell transplant in Fanconi anaemia using HLA-matched sibling umbilical cord blood cells". *Br J Haematol*, 85, 419-22.
94. Kohn, D. B., Weinberg, K. I., Nolte, J. A., Heiss, L. N., Lenarsky, C., Crooks, G. M., Hanley, M. E., Annett, G., Brooks, J. S., el-Khoureiy, A., and y cols. (1995). "Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency". *Nat Med*, 1, 1017-23.
95. Koller, M. R., Manchel, I., Maher, R. J., Goltry, K. L., Armstrong, R. D., and Smith, A. K. (1998). "Clinical-scale human umbilical cord blood cell expansion in a novel automated perfusion culture system". *Bone Marrow Transplant*, 21, 653-63.
96. Kurtzberg, J., Graham, M., Casey, J., Olson, J., Stevens, C. E., and Rubinstein, P. (1994). "The use of umbilical cord blood in mismatched related and unrelated hemopoietic stem cell transplantation". *Blood Cells*, 20, 275-83.

97. Kurtzberg, J., Laughlin, M., Graham, M. L., Smith, C., Olson, J. F., Halperin, E. C., Ciocchi, G., Carrier, C., Stevens, C. E., and Rubinstein, P. (1996). "Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients". *N Engl J Med*, 335, 157-66.
98. Lai, R., Visser, L., and Poppema, S. (1994). "Postnatal changes of CD45 expression in peripheral blood T and B cells". *Br J Haematol*, 87, 251-7.
99. Lamana, M. L., Regidor, C., Bornstein, R., Clemente, B., and Castro, M. A. (1990). "Criopreservación de médula ósea". *Sangre (Barc)*, 35, 451-7.
100. Lamana, M., Albella, B., Rodriguez, F., Regidor, C., and Bueren, J. A. (1999). "Conclusions of a national multicenter intercomparative study of in vitro cultures of human hematopoietic progenitors". *Bone Marrow Transplant*, 23, 373-80.
101. Lanier, L. L., Le, A. M., Civin, C. I., Loken, M. R., and Phillips, J. H. (1986). "The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes". *J Immunol*, 136, 4480-6.
102. Lapidot, T., Pflumio, F., Doedens, M., Murdoch, B., Williams, D. E., and Dick, J. E. (1992). "Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice". *Science*, 255, 1137-41.
103. Laporte, J. P., Gorin, N. C., Rubinstein, P., Lesage, S., Portnoi, M. F., Barbu, V., Lopez, M., Douay, L., and Najman, A. (1996). "Cord-blood transplantation from an unrelated donor in an adult with chronic myelogenous leukemia". *N Engl J Med*, 335, 167-70.
104. Laporte, J. P., Lesage, S., Portnoi, M. F., Landman, J., Rubinstein, P., Najman, A., and Gorin, N. C. (1998). "Unrelated mismatched cord blood transplantation in patients with hematological malignancies: a single institution experience". *Bone Marrow Transplant*, 22 Suppl 1, S76-7.

105. Larochelle, A., Vormoor, J., Hanenberg, H., Wang, J. C., Bhatia, M., Lapidot, T., Moritz, T., Murdoch, B., Xiao, X. L., Kato, I., Williams, D. A., and Dick, J. E. (1996). "Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy". *Nat Med*, 2, 1329-37.
106. LaSalle, J. M., and Hafler, D. A. (1991). "The coexpression of CD45RA and CD45RO isoforms on T cells during the S/G2/M stages of cell cycle". *Cell Immunol*, 138, 197-206.
107. Lazzari, L., De Bernardi, N., Villa, A., Porreti, L., Fermo, E., Lecchi, L., Rebulli, P., and Sirchia, G. (1998). "Cord blood stem cells expanded ex vivo with TPO, FLT-3, IL-6 and IL-11 and serum-free medium show engrafting potential in NOD/SCID mice [abstract]". *Blood*, 92 Suppl 1, 114a.
108. Lebeurier, L., Martin, T., and Shuman, M. A. (1997). "Primitive human megakaryocyte progenitors are enriched in cord blood compared with chemotherapy and G-CSF mobilized peripheral blood [abstract]". *Blood*, 90 Suppl 1, 148b.
109. Lee, S. M., Suen, Y., Chang, L., Bruner, V., Qian, J., Indes, J., Knoppel, E., van de Ven, C., and Cairo, M. S. (1996). "Decreased interleukin-12 (IL-12) from activated cord versus adult peripheral blood mononuclear cells and upregulation of interferon- gamma, natural killer, and lymphokine-activated killer activity by IL- 12 in cord blood mononuclear cells". *Blood*, 88, 945-54.
110. Locatelli, F., Rocha, V., Chastang, C., Arcese, W., Michel, G., Abecasis, M., Messina, C., Ortega, J., Badell-Serra, I., Plouvier, E., Souillet, G., Jouet, J. P., Pasquini, R., Ferreira, E., Garnier, F., and Gluckman, E. (1999). "Factors associated with outcome after cord blood transplantation in children with acute leukemia. Eurocord-Cord Blood Transplant Group". *Blood*, 93, 3662-71.
111. Lu, L., Xiao, M., Shen, R. N., Grigsby, S., and Broxmeyer, H. E. (1993). "Enrichment, characterization, and responsiveness of single primitive CD34 human umbilical cord blood hematopoietic progenitors with high proliferative and replating potential". *Blood*, 81, 41-8.

112. Madrigal, J. A., Cohen, S. B., Gluckman, E., and Charron, D. J. (1997). "Does cord blood transplantation result in lower graft-versus-host disease? It takes more than two to tango". *Hum Immunol*, 56, 1-5.
113. Malavasi, F., Funaro, A., Roggero, S., Horenstein, A., Calosso, L., and Mehta, K. (1994). "Human CD38: a glycoprotein in search of a function". *Immunol Today*, 15, 95-7.
114. Martinez-Laso, J., De Juan, D., Martinez-Quiles, N., Gomez-Casado, E., Cuadrado, E., and Arnaiz-Villena, A. (1995). "The contribution of the HLA-A, -B, -C and -DR, -DQ DNA typing to the study of the origins of Spaniards and Basques". *Tissue Antigens*, 45, 237-45.
115. Mayani, H., and Lansdorp, P. M. (1998). "Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells". *Stem Cells*, 16, 153-65.
116. Mazur, P. (1970). "Cryobiology: the freezing of biological systems". *Science*, 168, 939-49.
117. McCullough, J., Clay, M. E., Fautsch, S., Noreen, H., Segall, M., Perry, E., and Stroncek, D. (1994). "Proposed policies and procedures for the establishment of a cord blood bank". *Blood Cells*, 20, 609-26.
118. Merckenschlager, M., Ikeda, H., Wilkinson, D., Beverly, P. C., Trowsdale, J., Fisher, A. G., and Altmann, D. M. (1991). "Allorecognition of HLA-DR and -DQ transfectants by human CD45RA and CD45RO CD4 T cells: repertoire analysis and activation requirements". *Eur J Immunol*, 21, 79-88.
119. Millet, V., Lacroze, V., Bodiou, A. C., Dubus, J. C., C. D. E., and Unal, D. (1999). "[Ontogeny of the immune system]". *Arch Pediatr*, 6 Suppl 1, 14S-9S.
120. Miyawaki, T., Seki, H., Taga, K., Sato, H., and Taniguchi, N. (1985). "Dissociated production of interleukin-2 and immune (gamma) interferon by phytohaemagglutinin stimulated lymphocytes in healthy infants". *Clin Exp Immunol*, 59, 505-11.
121. Mollet, L., Sadat-Sowti, B., Duntze, J., Leblond, V., Bergeron, F., Calvez, V., Katlama, C., Debre, P., and Autran, B. (1998). "CD8hi+CD57+ T lymphocytes are enriched in antigen-specific T cells capable of down-modulating cytotoxic activity". *Int Immunol*, 10, 311-23.

122. Moore, M. A., and Metcalf, D. (1970). "Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo". *Br J Haematol*, 18, 279-96.
123. Moritz, T., Keller, D. C., and Williams, D. A. (1993). "Human cord blood cells as targets for gene transfer: potential use in genetic therapies of severe combined immunodeficiency disease". *J Exp Med*, 178, 529-36.
124. Nakahata, T., and Ogawa, M. (1982). "Hemopoietic colony-forming cells in umbilical cord blood with extensive capability to generate mono- and multipotential hemopoietic progenitors". *J Clin Invest*, 70, 1324-8.
125. Navarrete, C., Warwick, R., Armitage, S., Fehily, D., and Contreras, M. (1998). "The London Cord Blood Bank". *Bone Marrow Transplant*, 22 Suppl 1, S6-7.
126. Noort, W. A., Willemze, R., and Falkenburg, J. H. (1998). "Comparison of repopulating ability of hematopoietic progenitor cells isolated from human umbilical cord blood or bone marrow cells in NOD/SCID mice". *Bone Marrow Transplant*, 22 Suppl 1, S58-60.
127. Ochs, L. A., Miller, W. J., Filipovich, A. H., Haake, R. J., McGlave, P. B., Blazar, B. R., Ramsay, N. K., Kersey, J. H., and Weisdorf, D. J. (1994). "Predictive factors for chronic graft-versus-host disease after histocompatible sibling donor bone marrow transplantation". *Bone Marrow Transplant*, 13, 455-60.
128. Opie, T. M., Shields, L. E., and Andrews, R. G. (1998). "Cell-surface antigen expression in early and term gestation fetal hematopoietic progenitor cells". *Stem Cells*, 16, 343-8.
129. Pahwa, R. N., Fleischer, A., Than, S., and Good, R. A. (1994). "Successful hematopoietic reconstitution with transplantation of erythrocyte-depleted allogeneic human umbilical cord blood cells in a child with leukemia". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 4485-8.
130. Paiva, A., Freitas, A., Loureiro, A., Couceiro, A., Martinho, A., Simoes, O., Santos, P., Tomaz, J., Pais, M. L., and Breda Coimbra, H. (1998). "Functional aspects of cord blood lymphocytes response to polyclonal and allogeneic activation". *Bone Marrow Transplant*, 22 Suppl 1, S31-4.

131. Paloczi, K., Batai, A., Gopcsa, L., Ezsi, R., and Petranyi, G. G. (1998). "Immunophenotypic characterisation of cord blood B-lymphocytes". *Bone Marrow Transplant*, 22 Suppl 4, S89-91.
132. Perez-Cruz, I., Dominguez, E., Madrigal, J. A., and Cohen, S. B. (1998). "Foetal lymphocytes are more sensitive to freezing than adult lymphocytes within a mononuclear cell environment". *Bone Marrow Transplant*, 22 Suppl 1, S41-3.
133. Perez-Oteyza, J., Bornstein, R., Corral, M., Hermosa, V., Alegre, A., Torrabadella, M., Ramos, P., Garcia, J., Odriozola, J., and Navarro, J. L. (1998). "Controlled-rate versus uncontrolled-rate cryopreservation of peripheral blood progenitor cells: a prospective multicenter study. Group for Cryobiology and Biology of Bone Marrow Transplantation (CBTMO), Spain". *Haematologica*, 83, 1001-5.
134. Perez-Rivilla, A., Tejedor, J. C., and Gomez-Garcés, J. L. (1996). "Incidencia de infección congénita por citomegalovirus (CMV) en un area del sur de Madrid". VII Congreso Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (Torremolinos, Málaga), pp. 156; A20/8.
135. Pettengell, R., Luft, T., Henschler, R., Hows, J. M., Dexter, T. M., Ryder, D., and Testa, N. G. (1994). "Direct comparison by limiting dilution analysis of long-term culture- initiating cells in human bone marrow, umbilical cord blood, and blood stem cells". *Blood*, 84, 3653-9.
136. Piacibello, W., Sanavio, F., Severino, A., Dane, A., Gammaitoni, L., Fagioli, F., Perissinotto, E., Cavalloni, G., Kollet, O., Lapidot, T., and Aglietta, M. (1999). "Engraftment in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice of human CD34(+) cord blood cells after ex vivo expansion: evidence for the amplification and self-renewal of repopulating stem cells". *Blood*, 93, 3736-49.
137. Picker, L. J., Treer, J. R., Ferguson-Darnell, B., Collins, P. A., Buck, D., and Terstappen, L. W. (1993). "Control of lymphocyte recirculation in man. I. Differential regulation of the peripheral lymph node homing receptor L-selection on T cells during the virgin to memory cell transition". *J Immunol*, 150, 1105-21.

138. Pojda, Z., Machaj, E., Debski, R., Oldak, T., Cesarz, R., Krawczyk, E., and Braun, B. (1998). "Organization of the cord blood bank in Warsaw, Poland: current status and future prospects". *Bone Marrow Transplant*, 22 Suppl 1, S13.
139. Prince, H. E., York, J., and Jensen, E. R. (1992). "Phenotypic comparison of the three populations of human lymphocytes defined by CD45RO and CD45RA expression". *Cell Immunol*, 145, 254-62.
140. Puri, S., Shieh, D. C., Canavan, A., and Kao, K. J. (1993). "Quantitation and characterization of plasma HLA in neonates of different gestational ages". *Tissue Antigens*, 42, 67-71.
141. Querol, S., Gabarro, M., Amat, L., Gonzalez, S., Gomez, M. D., de la Calle, O., Madoz, P., Badell, I., and Garcia, J. (1998). "The placental blood program of the Barcelona Cord Blood Bank". *Bone Marrow Transplant*, 22 Suppl 1, S3-5.
142. Racadot, E., Gay, C., Billot, M., and Hervé, P. (1997). "Detection of intracellular cytokine production by cord blood T cells using flow cytometry". *Blood*, 90 Suppl 1, 60b.
143. Regidor, C., Posada, M., Monteagudo, D., Garaulet, C., Somolinos, N., Fores, R., Briz, M., and Fernandez, M. N. (1999). "Umbilical cord blood banking for unrelated transplantation: evaluation of cell separation and storage methods". *Exp Hematol*, 27, 380-5.
144. Rice, A., Flemming, C., Case, J., Stevenson, J., Gaudry, L., and Vowels, M. (1999). "Comparative study of the in vitro behavior of cord blood subpopulations after short-term cytokine exposure". *Bone Marrow Transplant*, 23, 211-20.
145. Risdon, G., Gaddy, J., Horie, M., and Broxmeyer, H. E. (1995). "Alloantigen priming induces a state of unresponsiveness in human umbilical cord blood T cells". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 2413-7.
146. Roncarolo, M. G., Bigler, M., Martino, S., Ciuti, E., Tovo, P. A., and Wagner, J. (1996). "Immune functions of cord blood cells before and after transplantation". *J Hematother*, 5, 157-60.

147. Roy, J., Platt, J. L., and Weisdorf, D. J. (1993). "The immunopathology of upper gastrointestinal acute graft-versus-host disease. Lymphoid cells and endothelial adhesion molecules". *Transplantation*, 55, 572-8.
148. Rubinstein, P., Rosenfield, R. E., Adamson, J. W., and Stevens, C. E. (1993). "Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution". *Blood*, 81, 1679-90.
149. Rubinstein, P., Taylor, P. E., Scaradavou, A., Adamson, J. W., Migliaccio, G., Emanuel, D., Berkowitz, R. L., Alvarez, E., and Stevens, C. E. (1994). "Unrelated placental blood for bone marrow reconstitution: organization of the placental blood program". *Blood Cells*, 20, 587-96.
150. Rubinstein, P., Dobrila, L., Rosenfield, R. E., Adamson, J. W., Migliaccio, G., Migliaccio, A. R., Taylor, P. E., and Stevens, C. E. (1995). "Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 10119-22.
151. Rubinstein, P., Carrier, C., Scaradavou, A., Kurtzberg, J., Adamson, J., Migliaccio, A. R., Berkowitz, R. L., Cabbad, M., Dobrila, N. L., Taylor, P. E., Rosenfield, R. E., and Stevens, C. E. (1998). "Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors". *N Engl J Med*, 339, 1565-77.
152. Sautois, B., Fillet, G., and Beguin, Y. (1997). "Comparative cytokine production by in vitro stimulated mononucleated cells from cord blood and adult blood". *Exp Hematol*, 25, 103-8.
153. Schelonka, R. L., and Infante, A. J. (1998). "Neonatal immunology". *Semin Perinatol*, 22, 2-14.
154. Schriber, J. R., and Herzig, G. P. (1997). "Transplantation-associated thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome". *Semin Hematol*, 34, 126-33.

155. Scott, I., J. O. S., Bunce, M., Tiercy, J. M., Arguello, J. R., Firman, H., Goldman, J., Prentice, H. G., Little, A. M., and Madrigal, J. A. (1998). "Molecular typing shows a high level of HLA class I incompatibility in serologically well matched donor/patient pairs: implications for unrelated bone marrow donor selection". *Blood*, 92, 4864-71.
156. Shlebak, A. A., Roberts, I. A., Stevens, T. A., Syzdlo, R. M., Goldman, J. M., and Gordon, M. Y. (1998). "The impact of antenatal and perinatal variables on cord blood haemopoietic stem/progenitor cell yield available for transplantation". *Br J Haematol*, 103, 1167-71.
157. Shlebak, A. A., Marley, S. B., Roberts, I. A., Davidson, R. J., Goldman, J. M., and Gordon, M. Y. (1999). "Optimal timing for processing and cryopreservation of umbilical cord haematopoietic stem cells for clinical transplantation". *Bone Marrow Transplant*, 23, 131-6.
158. Shpall, E. J., Quinones, R., Hami, L., Jones, R., Bearman, S., Cagnoni, P., Giller, R., Nieto, Y., Roman-Unfer, S., and McNiece, I. (1998). "Transplantation of cancer patients receiving high dose chemotherapy with ex vivo expanded cord blood cells [abstract]". *Blood*, 92 Suppl 1, 646a.
159. Siegal, F. P. (1981). "Functional ontogeny of human lymphoid cells as a factor in maternal-fetal tolerance". *Am J Reprod Immunol*, 1, 65-8.
160. Sierra, J., Storer, B., Hansen, J. A., Bjerke, J. W., Martin, P. J., Petersdorf, E. W., Appelbaum, F. R., Bryant, E., Chauncey, T. R., Sale, G., Sanders, J. E., Storb, R., Sullivan, K. M., and Anasetti, C. (1997). "Transplantation of marrow cells from unrelated donors for treatment of high-risk acute leukemia: the effect of leukemic burden, donor HLA-matching, and marrow cell dose". *Blood*, 89, 4226-35.
161. Stary, J., Bartunkova, J., Kobylka, P., Vavra, V., Hrusak, O., Calda, P., Kral, V., and Svorc, K. (1996). "Successful HLA-identical sibling cord blood transplantation in a 6-year-old boy with leukocyte adhesion deficiency syndrome". *Bone Marrow Transplant*, 18, 249-52.

162. Stevenson, J., Milross, C., Collins, C., Vowels, M., and Rice, A. (1998). "Facilitation of human cord blood engraftment in NOD SCID mice by cytokine-mediated expansion: influence of combination and culture duration [abstract]". *Blood*, 92 Suppl 1, 114a.
163. Stiff, P. J., Koester, A. R., Weidner, M. K., Dvorak, K., and Fisher, R. I. (1987). "Autologous bone marrow transplantation using unfractionated cells cryopreserved in dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch without controlled-rate freezing". *Blood*, 70, 974-8.
164. Stiff, P., Pecora, A., Parthasarathy, M., Preti, R., Chen, B., Douville, J., Malhotra, D., Harrison, J., Bayer, R., Goltry, K., Armstrong, R. D., and Smith, A. (1998). "Umbilical cord blood transplants in adults using a combination of unexpanded and ex vivo expanded cells: preliminary clinical observations [abstract]". *Blood*, 92 Suppl 1, 646a.
165. Tavian, M., Coulombel, L., Luton, D., Clemente, H. S., Dieterlen-Lievre, F., and Peault, B. (1996). "Aorta-associated CD34+ hematopoietic cells in the early human embryo". *Blood*, 87, 67-72.
166. Tedder, R. S., Zuckerman, M. A., Goldstone, A. H., Hawkins, A. E., Fielding, A., Briggs, E. M., Irwin, D., Blair, S., Gorman, A. M., Patterson, K. G., and y cols. (1995). "Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank". *Lancet*, 346, 137-40.
167. Thierry, D., Traineau, R., Adam, M., Delachaux, V., Brossard, Y., Richard, P., Gerotta, A., Devergie, A., Benbunan, M., and Gluckman, E. (1990). "Hematopoietic stem cell potential from umbilical cord blood". *Nouv Rev Fr Hematol*, 32, 439-40.
168. Thierry, D., Hervatin, F., Traineau, R., Brossard, Y., Stark, R., Benbunan, M., and Gluckman, E. (1992). "Hematopoietic progenitors cells in cord blood". *Bone Marrow Transplant*, 9 Suppl 1, 101-4.
169. Traineau, R., Thierry, D., Djenandar, F., Benbunan, M., and Gluckman, E. (1993). "Collection of sibling cord blood for hematopoietic stem cell transplantation". *J Hematother*, 2, 231-2.

170. Traycoff, C. M., Abboud, M. R., Laver, J., Brandt, J. E., Hoffman, R., Law, P., Ishizawa, L., and Srour, E. F. (1994a). "Evaluation of the in vitro behavior of phenotypically defined populations of umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells". *Exp Hematol*, 22, 215-22.
171. Traycoff, C. M., Abboud, M. R., Laver, J., Clapp, D. W., and Srour, E. F. (1994b). "Rapid exit from G0/G1 phases of cell cycle in response to stem cell factor confers on umbilical cord blood CD34+ cells an enhanced ex vivo expansion potential". *Exp Hematol*, 22, 1264-72.
172. Turner, C. W., Luzins, J., and Hutcheson, C. (1992). "A modified harvest technique for cord blood hematopoietic stem cells". *Bone Marrow Transplant*, 10, 89-91.
173. van Hennik, P. B., Verstegen, M. M., Bierhuizen, M. F., Limon, A., Wognum, A. W., Cancelas, J. A., Barquinero, J., Ploemacher, R. E., and Wagemaker, G. (1998). "Highly efficient transduction of the green fluorescent protein gene in human umbilical cord blood stem cells capable of cobblestone formation in long-term cultures and multilineage engraftment of immunodeficient mice". *Blood*, 92, 4013-22.
174. van Rood, J. J., Schipper, R. F., Bakker, J. N., van der Zanden, H. G., and Oudshoorn, M. (1998). "Bone Marrow Donors Worldwide and cord blood stem cell transplantation". *Bone Marrow Transplant*, 22 Suppl 1, S19-21.
175. Vaziri, H., Dragowska, W., Allsopp, R. C., Thomas, T. E., Harley, C. B., and Lansdorp, P. M. (1994). "Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 9857-60.
176. Verstegen, M. M., van Hennik, P. B., Terpstra, W., van den Bos, C., Wielenga, J. J., van Rooijen, N., Ploemacher, R. E., Wagemaker, G., and Wognum, A. W. (1998). "Transplantation of human umbilical cord blood cells in macrophage- depleted SCID mice: evidence for accessory cell involvement in expansion of immature CD34+CD38- cells". *Blood*, 91, 1966-76.

177. Vilmer, E., Sterkers, G., Rahimy, C., Denamur, E., Elion, J., Broyart, A., Lescoeur, B., Tiercy, J. M., Gerota, J., and Blot, P. (1992). "HLA-mismatched cord-blood transplantation in a patient with advanced leukemia". *Transplantation*, 53, 1155-7.
178. Vormoor, J., Lapidot, T., Pflumio, F., Risdon, G., Patterson, B., Broxmeyer, H. E., and Dick, J. E. (1994). "Immature human cord blood progenitors engraft and proliferate to high levels in severe combined immunodeficient mice". *Blood*, 83, 2489-97.
179. Vowels, M. R., Tang, R. L., Berdoukas, V., Ford, D., Thierry, D., Purtilo, D., and Gluckman, E. (1993). "Brief report: correction of X-linked lymphoproliferative disease by transplantation of cord-blood stem cells". *N Engl J Med*, 329, 1623-5.
180. Wagner, J. E., Broxmeyer, H. E., Byrd, R. L., Zehnbauser, B., Schmeckpeper, B., Shah, N., Griffin, C., Emanuel, P. D., Zuckerman, K. S., Cooper, S., and y cols. (1992). "Transplantation of umbilical cord blood after myeloablative therapy: analysis of engraftment". *Blood*, 79, 1874-81.
181. Wagner, J. E., Kernan, N. A., Steinbuch, M., Broxmeyer, H. E., and Gluckman, E. (1995). "Allogeneic sibling umbilical-cord-blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease". *Lancet*, 346, 214-9.
182. Wagner, J. E., Rosenthal, J., Sweetman, R., Shu, X. O., Davies, S. M., Ramsay, N. K., McGlave, P. B., Sender, L., and Cairo, M. S. (1996). "Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft-versus-host disease". *Blood*, 88, 795-802.
183. Wang, J. C., Doedens, M., and Dick, J. E. (1997). "Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID-repopulating cell assay". *Blood*, 89, 3919-24.
184. Wang, X. N., Sviland, L., Ademokun, A. J., Dunn, J., Cavanagh, G., Proctor, S. J., and Dickinson, A. M. (1998). "Cellular alloreactivity of human cord blood cells detected by T-cell frequency analysis and a human skin explant model". *Transplantation*, 66, 903-9.

185. Weisdorf, D. J., Snover, D. C., Haake, R., Miller, W. J., McGlave, P. B., Blazar, B., Ramsay, N. K., Kersey, J. H., and Filipovich, A. (1990). "Acute upper gastrointestinal graft-versus-host disease: clinical significance and response to immunosuppressive therapy". *Blood*, 76, 624-9.
186. Wingard, J. R. (1990). "Advances in the management of infectious complications after bone marrow transplantation". *Bone Marrow Transplant*, 6, 371-83.
187. Zaia, J. A. (1990). "Viral infections associated with bone marrow transplantation". *Hematol Oncol Clin North Am*, 4, 603-23.
188. Zanjani, E. D., Pallavicini, M. G., Ascensao, J. L., Flake, A. W., Langlois, R. G., Reitsma, M., MacKintosh, F. R., Stutes, D., Harrison, M. R., and Tavassoli, M. (1992). "Engraftment and long-term expression of human fetal hemopoietic stem cells in sheep following transplantation in utero". *J Clin Invest*, 89, 1178-88.
189. Zanjani, E. D., Almeida-Porada, G., and Flake, A. W. (1996). "The human/sheep xenograft model: a large animal model of human hematopoiesis". *Int J Hematol*, 63, 179-92.
190. Zix-Kieffer, I., Langer, B., Eyer, D., Acar, G., Racadot, E., Schlaeder, G., Oberlin, F., and Lutz, P. (1996). "Successful cord blood stem cell transplantation for congenital erythropoietic porphyria (Gunther's disease)". *Bone Marrow Transplant*, 18, 217-20.

ANEXOS

Anexo I

HOJA DE INFORMACIÓN SOBRE LA DONACIÓN

DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL

En las primeras horas de vida, la sangre del recién nacido contiene gran cantidad de células progenitoras similares a las que residen en la médula ósea, especializadas en la renovación permanente de las células maduras de la sangre (leucocitos, hematíes y plaquetas). Estas células pueden obtenerse después del nacimiento a partir de la sangre contenida en el cordón umbilical, ***sin que ello ocasione ningún perjuicio para la madre ni para el niño***, y ser trasplantadas en pacientes con enfermedades de médula ósea que no disponen de donante. Los resultados terapéuticos con trasplante de sangre de cordón umbilical son muy prometedores.

Los bancos de sangre de cordón pretenden disponer de un número alto de donaciones para la realización de este tipo de trasplantes, y su objetivo es confirmar las expectativas generadas con este nuevo tratamiento. Para llevar a cabo su tarea necesitan de la colaboración de muchas personas, por lo que le proponemos su participación, aceptando donar desinteresadamente la sangre del cordón umbilical después del nacimiento de su hijo para cualquier paciente que precise un trasplante de este tipo.

Interés terapéutico de la sangre de cordón:

Todos los años, miles de personas desarrollan una enfermedad grave de la médula ósea o nacen con alteraciones genéticas de la misma que comprometen su vida. Para ellos, la única posibilidad de curación es un trasplante de médula ósea. Los mejores resultados se producen cuando el donante de médula ósea es compatible con el paciente. Ese donante se busca habitualmente entre los hermanos del paciente, o a partir de una lista de donantes voluntarios. Lamentablemente, solo se encuentran donantes compatibles en el 30% de los enfermos.

La realización de un trasplante de médula ósea incompatible comporta riesgos muy importantes para el paciente. Las células de sangre de cordón umbilical son ***inmunológicamente más inmaduras***, lo que permite realizar trasplantes ***aunque no sean totalmente compatibles*** sin un riesgo tan elevado como cuando se trasplanta médula ósea.

La sangre de cordón umbilical es una nueva fuente de trasplante, con unas ***características biológicas especiales***. Todo ello facilita el que puedan beneficiarse de la posibilidad de un trasplante cada vez mayor número de pacientes. La ventaja adicional de la sangre de cordón umbilical es que está disponible en un Banco de Cordón, lo cual significa que ***puede ser trasplantada inmediatamente***, evitando retrasos que son críticos en muchos enfermos en espera de trasplante.

Procedimiento de la donación de la sangre de cordón umbilical

La sangre de cordón umbilical se recoge después del nacimiento del niño y tras la sección del cordón umbilical. Para ello, se realiza una simple punción del cordón umbilical mientras que la placenta está todavía en el útero. ***Sepa Ud. que esta recogida no comporta ningún peligro, ni para usted, ni para su hijo.***

Para la donación de la sangre de cordón resulta imprescindible realizar:

1. - Una historia clínica detallada acerca de las posibles enfermedades de los padres de naturaleza infecciosa o hereditaria, que contraindiquen el empleo de la sangre de cordón.
- 2.- La realización a la madre en el momento del parto, y opcionalmente tres meses después, de un análisis de sangre para descartar cualquier proceso infeccioso que pudiera ser transmisible a la sangre de cordón, en especial el test de la hepatitis B, el test de la hepatitis C, y el test del VIH del SIDA.
3. - Un examen clínico del recién nacido, y opcionalmente tres meses después, por un pediatra.

Cualquier resultado patológico que se demuestre en los estudios realizados con motivo de la donación de la sangre de cordón umbilical se le comunicará a Ud. debidamente por el médico responsable.

La sangre de cordón umbilical obtenida con motivo de la donación será empleada para la realización de un trasplante a cualquier paciente anónimo del mundo que lo precise, sin otra preferencia que la mejor compatibilidad posible entre donante y receptor.

Los datos sobre la sangre de cordón serán incluidos de forma codificada en las bases de datos de nuestro banco y la información podrá ser intercambiada con otros datos similares de otros países. ***Todos los datos serán tratados de forma confidencial.*** Estos criterios de confidencialidad tienen como contrapartida la imposibilidad de saber cuándo será utilizada su donación, para qué paciente y con qué resultado.

Puede ocurrir que la unidad de sangre de cordón umbilical no reúna los requisitos mínimos para ser procesada (por ejemplo, que el contenido de células sea insuficiente). En ese caso, la unidad obtenida ***no se guardará en el Banco de Sangre de Cordón***, y podrá ser desechada o, alternativamente, utilizada con fines investigacionales.

No se entregará ninguna indemnización económica ni de ningún otro tipo por la donación de la sangre de cordón umbilical.

Anexo II

**CONSENTIMIENTO INFORMADO
PARA LA DONACIÓN VOLUNTARIA
DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL**

Fecha:_____

Dña:_____

DNI_____ Edad_____ con domicilio en_____

En la calle_____

nº_____ Código Postal_____ Ciudad_____

Provincia_____ Teléfono_____

Nombre de la persona que informó_____

Declaro que:

- Entiendo que la sangre de cordón umbilical que consiento en donar con la firma de este documento, será utilizada para realizar un trasplante para cualquier paciente anónimo que así lo precise.
- Entiendo que la información referente a mi persona y a la de mi hijo/a será tratada de forma confidencial y codificada de forma que quede protegida mi identidad y la de mi hijo/a.
- Consiento que se realice un examen clínico a mi hijo en el momento del nacimiento y opcionalmente después de los 3 meses por un pediatra.
- Consiento en que se me extraiga una muestra de sangre para la realización de los análisis exigibles (VIH-SIDA, Hepatitis B, Hepatitis C, Sífilis, Toxoplasmosis y Citomegalovirus) el día del parto y opcionalmente después de los 3 meses.
- Entiendo que cualquier resultado patológico en los estudios realizados a mí o a mi hijo/a con motivo de la donación de la sangre de cordón me será necesariamente comunicado por el médico responsable.

- Entiendo que este consentimiento no obliga a la recogida de la sangre de cordón umbilical si las circunstancias del parto no son las idóneas.
- Entiendo que la sangre de cordón umbilical recogida pueda no ser adecuada para trasplante y, en ese caso, ser desechada o utilizada con fines investigacionales.
- Entiendo que no recibiré ninguna compensación económica ni de ningún otro tipo por la donación.
- Conservo la posibilidad de renunciar a este consentimiento en cualquier momento hasta el nacimiento de mi hijo, sin que tenga que dar en su caso ningún tipo de explicación.
- He leído y comprendido toda la información dada, estoy satisfecha de la información recibida, he podido formular todas las preguntas que he creído conveniente y me han aclarado todas las dudas planteadas.
- En consecuencia, doy mi consentimiento para la donación de la sangre de cordón umbilical.

Firma de la persona que informó:

Firma de la donante:

Anexo III

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL

I - RECOGIDA DE DATOS DE BANCO DE SANGRE

SCU Nº: _____

Nombre: _____ Edad: _____

NºHistoria: _____ Teléfono: _____

Domicilio: _____

Lugar de nacimiento (País) _____ Raza: _____

1.- Nº de embarazos previos: _____

2.- Nº de hijos vivos: _____

3.- ¿Ha tenido hijos con malformaciones, alguna enfermedad congénita o subnormalidad? Sí ____ No ____

4.- Hábitos tóxicos:

4.1. Tabaco Sí ____ No ____ Cigarrillos / día

4.2. Alcohol Sí ____ No ____ Cantidad: _____

4.3. Drogas Sí ____ No ____

4.4. Medicamentos Sí ____ No ____ ¿Cuáles?: _____

5.- ¿Presenta historia de malformaciones, abortos, o anemia en su familia o en la de su marido?
(subrayar la respuesta afirmativa)

6.- ¿Padece algún tipo de enfermedad en el momento actual?: _____

7.- Serología durante el embarazo : (indicar Pos o Neg)

7.1. Ag-HBs: _____ 7.2. Anti-VHC: _____ 7.3. Anti-VIH: _____

8.- Grupo sanguíneo y Rh: _____

9.- Escrutinio de anticuerpos irregulares Positivo ____ Negativo ____

10.- Se extrae muestra para serología Sí ____ No ____

NOTA: Si la respuesta en 3, 4.3., 7.1., 7.2., 7.3. ó 9 es afirmativa o positiva, **no continuar** con el protocolo

Fecha: _____

Firmado: _____

II - RECOGIDA DE DATOS DE PARITORIO

1.- Selección de donantes: Neonatos sanos a término, nacidos de parto vaginal.

Causas de exclusión:

SI NO

- | | | |
|---|---|-------|
| 1.1 Parto prematuro (< 32 semanas de gestación). | _____ | _____ |
| 1.2 Rotura de bolsa de líquido amniótico de más de 12 horas | _____ | _____ |
| 1.3. Fiebre materna (> 38°C) | _____ | _____ |
| 1.4. Presencia de meconio en el líquido amniótico. | _____ | _____ |
| 1.5. Sospecha de sufrimiento fetal. | _____ | _____ |
| 1.6. Anemia materna (Hb < 10.5 g/dL) | _____ | _____ |
| 1.7. Anticuerpos irregulares en la madre. | _____ | _____ |
| 1.8. Cesárea. | _____ | _____ |
| 1.9. Serología positiva: | | |
| Toxoplasmosis | IgM _____ (la positividad para IgG no es causa de exclusión) | |
| Rubeola | IgM _____ (" " ") | |
| CMV | IgM _____ (" " ") | |
| Anti - VIH | Pos _____ Neg _____ | |
| Anti - VHC | Pos _____ Neg _____ | |
| Ag - HBs | Pos _____ Neg _____ | |
| Lues (RPR) | Pos _____ Neg _____ | |

1.10. Otros: _____

2.- ¿Existe alguna anomalía evidente en el recién nacido: malformaciones, disfunción orgánica, etc? Sí _____ No _____ ¿Cuál? _____

3.- ¿Se ha utilizado anestesia epidural? Sí _____ No _____ Otras medicaciones administradas durante el parto: _____

4.- ¿Se realiza recogida de sangre de cordón en bolsa? Sí _____ No _____

5.- Planta y habitación de ingreso: _____

Fecha y hora de parto: _____

Firmado: _____

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL

I - RECOGIDA DE DATOS DEL RECIÉN NACIDO

SCU Nº: _____

Nombre de la madre: _____

Edad: _____ NºHistoria: _____

1- Peso: _____

2- Sexo: _____

3- APGAR: 1' _____
5' _____

4- Grupo sanguíneo: _____ CD: _____

5- Examen físico del recién nacido:

- | | |
|-----------------------------|----------------------|
| 5.1 Estado general | 5.13 Paladar |
| 5.2 Movimientos espontáneos | 5.14 Cuello |
| 5.3 Reacción a estímulos | 5.15 Tórax |
| 5.4 Llanto | 5.16 Corazón |
| 5.5 Color | 5.17 Pulmones |
| 5.6 Piel, pelo, uñas | 5.18 Abdomen |
| 5.7 Respiración | 5.19 Cordón, ombligo |
| 5.8 Cabeza | 5.20 Genitales |
| 5.9 Cara | 5.21 Ano |
| 5.10 Ojos | 5.22 Espalda |
| 5.11 Oídos | 5.23 Extremidades |
| 5.12 Nariz | 5.24 Neurológico |

Patología: _____

Fecha y hora del reconocimiento: _____

Firmado: _____

II - RECOGIDA DE DATOS DE SEROLOGÍA Y LACTANTE

Nombre de la madre: _____

Edad: _____ N° Historia: _____

1- Serología en el parto:

Fecha: _____

VIH : _____

VHC : _____

HBsAg : _____

Toxoplasma : _____

CMV : _____

Sífilis : _____

2- Serología a los 3 meses:

Fecha: _____

VIH : _____

VHC : _____

HBsAg : _____

Toxoplasma : _____

CMV : _____

Sífilis : _____

3- Estado clínico del lactante:

Estudio metabólico: Negativo: _____ Positivo: _____

¿Ha presentado algún tipo de patología importante desde el momento del parto hasta el momento actual? : Sí: _____ No: _____

En caso afirmativo ¿Cuál ha sido? _____

Fecha: _____

Firmado: _____

Anexo IV

BANCO DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL**HOSPITAL 12 DE OCTUBRE****Ctra. ANDALUCÍA Km 5.4, 28041 MADRID****Dr.R.BORNSTEIN Tfno:913 908 419; Fax: 913 908 358****Dra.F.GILSANZ Tfno:913 908 654; Fax: 913 908 358****RECOGIDA DE DATOS DEL FRACCIONAMIENTO Y CRIOPRESERVACIÓN**

SCU nº _____ Código _____

Recogida de la sangre: Fecha _____ Hora _____

Procesamiento: Fecha _____ Hora _____

Sangre conservada a _____ °C durante _____ Horas.

Datos de la madre:

Apellidos _____ Nombre _____

Hª Clínica nº _____ Origen Étnico _____

HLA: _____

Serología:	Retipaje	Microbiología	a los tres meses
Hepatitis B:	_____	_____	_____
Hepatitis C:	_____	_____	_____
VIH 1y2:	_____	_____	_____
Sífilis:	_____	_____	_____
Toxoplasmosis:	_____	_____	_____
CMV:	_____	_____	_____

Muestra Inicial:

Volumen (ml): _____ volumen procesado: _____

Conc. leucoc.(x10⁶/ml) : _____Leucoc.totales (x10⁹) _____ Leucoc. procesados (x10⁹) _____CMN: _____ % CMN totales (x10⁹): _____

Control microbiológico: _____ Grupo ABO, Rh: _____

Fraccionamiento con HES 6% (Grifols)

Leucoc. ($\times 10^6/\text{ml.}$): _____ Vol. _____ ml Vol. para mezclar _____
Leucoc. totales recuperados ($\times 10^9$): _____ Leucoc. para mezclar _____
Rendimiento fraccionamiento: (leucoc. recuperados / leucoc. procesados): _____ %
CD34 : _____ % CD34 totales ($\times 10^6$): _____
CFU-GM (5×10^4 cel.): _____ CFU-GM totales ($\times 10^4$): _____
BFU-E (5×10^4 cel.): _____ BFU-E totales ($\times 10^4$): _____
CFU-GEMM (5×10^4 cel) : _____ CFU-GEMM totales ($\times 10^4$) : _____
HLA : _____

Congelación. Muestra final (Mezcla)

Concentración Leucoc. ($\times 10^6/\text{ml.}$): _____ Viabilidad (azul tripan): _____ %

Almacenamiento.:	Recipientes	Localización
SCU:	_____	_____
Suero Materno:	_____	_____
DNA Cordón:	_____	_____
Plasma Cordón:	_____	_____
Cél. congeladas:	_____	_____

Descongelación.

Bolsas: Fecha _____ Viabilidad: (azul tripan) _____ %
Concentr. celular ($\times 10^6/\text{ml.}$): _____ Leucoc. totales ($\times 10^9$): _____
Rendimiento criopreservación: (leucoc. descongelación / leucoc. HES) _____ %
CFU-GM (5×10^4 cel.): _____ CFU-GM totales ($\times 10^4$): _____ Rend.: _____
BFU-E (5×10^4 cel.): _____ BFU-E totales ($\times 10^4$): _____ Rend.: _____
CFU-GEMM (5×10^4 cel) : _____ CFU-GEMM totales ($\times 10^4$) : _____ Rend.: _____

Tubos 1,8 ml: Fecha _____ Estudio: _____
Suero Materno: Fecha _____ Estudio: _____
DNA Cordón: Fecha _____ Estudio: _____
Plasma Cordón: Fecha _____ Estudio: _____

Anexo V

SOLICITUD DE BÚSQUEDA

Apellidos: _____ Nombre: _____ Fecha: _____

Fecha nacimiento: _____ Raza / País de origen: _____

Sexo: Masc: ☐ Fem: ☐ Peso corporal (kg): _____ ABO: _____ Rh: _____

Diagnóstico y Estadío: _____ Fecha del Diagnóstico: _____

Tipaje HLA del Paciente

Antígenos: A: _____ B: _____ C: _____ DR: _____ DQ: _____

Laboratorio HLA: _____ Fecha del análisis: _____

NOTA: POR FAVOR adjúntese el INFORME DEL ESTUDIO HLA

NOTA: En caso de localizarse una unidad compatible, se requerirá un tipaje de confirmación

Médico Responsable: _____ BÚSQUEDA DE DONANTE DE MÉDULA

Centro de Trasplante: _____ Preliminar ☐ Fecha: _____

Dirección: _____ Formal ☐ Fecha de inicio: _____

Donante Compatible: SI ☐ NO ☐

Teléfono: _____ Fax: _____

Tipaje Familiar (POR FAVOR adjúntese el INFORME DEL ESTUDIO HLA)

PARENTESCO	NOMBRE	HLA - A	HLA - B	HLA - C	DR	DQ
Madre						
Padre						
Hermano [1]						
Hermano [2]						
Hermano [3]						
Hermano [4]						

Comentarios sobre la Urgencia y otras consideraciones especiales: _____

Enviar las solicitudes al Dr. Rafael Bornstein, Tfno 390-8419; Fax 390-8358, o a la Dra. Florinda Gilsanz, Tfno 390-8654; Fax 390-8358.

Por favor, comuníquenos si no fuera necesario continuar la búsqueda después de solicitada.

Anexo VI

BANCO DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL
HOSPITAL 12 DE OCTUBRE
Ctra. ANDALUCÍA Km 5.4, 28041 MADRID
Dr.R.BORNSTEIN Tfno:913 908 419; Fax: 913 908 358
Dra.F.GILSANZ Tfno:913 908 654; Fax: 913 908 358

INFORME PRELIMINAR DE COMPATIBILIDAD

Fecha del informe:

Búsqueda solicitada por:
Centro de Trasplante:
Dirección:
TEL./FAX:

ID Paciente:
Fecha Solicitud:
Última búsqueda:

Datos del Paciente

Apellidos:
Nombre:
Diagnóstico:

Fecha Nacimiento:
Etnicidad:

Sexo:
Peso (kg):

HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DRB1
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

Unidades de Sangre de Cordón Umbilical

CODIGO	HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DRB1	Vol (ml)	CN ($\times 10^6$)	Nivel Comp.
--------	-------	-------	--------	----------	-------------	-------------------------	----------------

Unidades con 0 incompatibilidades

Unidades con 1 incompatibilidad

Unidades con 2 incompatibilidades

Por favor confirme la recepción por FAX: 91-390-8358

Número de páginas recibidas () fecha : _____ firma: _____

Anexo VII

BANCO DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL
HOSPITAL 12 DE OCTUBRE
Ctra. ANDALUCÍA Km 5.4, 28041 MADRID
Dr.R.BORNSTEIN Tfno:913 908 419; Fax: 913 908 358
Dra.F.GILSANZ Tfno:913 908 654; Fax: 913 908 358

INFORME: UNIDAD SCU-000

Fecha del informe:

Dirigido a:

Centro:

FAX:

PACIENTE:

ID Paciente:

HLA-A		HLA-B		HLA-DR		HLA-DRB1	
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

UNIDAD: Código SCU-000

Volumen sangre de cordón obtenido	(ml):	000
Separación celular: HES 1,2% volumen	(ml):	0
Solución crioprotectora (DMSO 10%)	(ml):	0
Criopreservación: Bolsa Cryocyte	(ml):	00
Número total de células nucleadas	($\times 10^7$):	00,0
Número total de células CD34+	($\times 10^6$):	0,00
Número total de CFU-GM	($\times 10^4$):	00,0
HLA:	A 0,0 B 0,0 DR 0,0 DRB1*0000,0000	

Cultivos bacterianos (aeróbico y anaeróbico):

Grupo ABO/Rh:

Sexo:

Raza:

Pruebas serológicas (suero materno):

Parto (dd/mm/aa)

Control (dd/mm/aa)

HBsAg
Anti-HBc
Anti-VHC
Anti-VIH 1/2
TPHA
Toxoplasma (IgG)
CMV (IgG)

Por favor, indíquese lo antes posible si esta Unidad debe ser asignada a su paciente. En ese caso, después del trasplante se le solicitará regularmente los datos de seguimiento para el control de calidad y evaluación del programa de trasplante de sangre de cordón umbilical.

